VOLUMEN 9 OCTUBRE-DICIEMBRE 1956 NUM. 4

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
20 MAR.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Arnaldo Socias Amorós, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. D. Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

SUMARIO

Páginas

Albert Jan Kluyver (†), por *Gonzalo Sierra* 349

Antibiograma para asociaciones de antibióticos, sobre papel de filtro impregnado, en silueta múltiple, por *A. Socias* y *A. Portolés* 353

Microscopía electrónica de las formas «L» y filtrables del *Agrobacterium tumefaciens*, por *M. Rubio Huertos* y *P. R. Desjardins* 375

El *Bacillus subtilis* como flora normal del pimentón, por *A. Socias* y *J. Pérez Silva* 383

Acción de la luz ultravioleta sobre los *Rhizobium*, por *Eulalia Cabezas de Herrera* 397

Identificación de bacteriófagos mediante técnicas serológicas. I. Bacteriófagos aislados a partir de heces humanas, por *M. Luisa Alonso* 421

Nueva técnica para la identificación del *Pseudomonas savastanoi* (conclusión), por R. Beltrá 433

VOLUMEN 9 1956

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Arnaldo Socias Amorós, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. D. Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE D ESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 144 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.

SUMARIO DEL NUM. 1

Posibilidades de obtención de sueros hiperinmunes de cobayo con los virus de las encefalitis de San Luis y Japonesa B, por *E. Gallardo Martínez* y *A. P. García Gancedo* 1

Observaciones sobre los cortes histológicos de los tumores producidos en el olivo por el *Ps. savastanoi*, por *R. Beltrá* 29

El *Sporobolomyces Hispanicus*, nueva especie de *Sporobolomycetaceae* aislado de extracto de corteza de encina, por *Fernando Peláez Campomanes* y *Carlos Ramírez Gómez* 37

La neurovacuna conserva siempre sus primitivas afinidades dérmicas, por *E. Gallardo Martínez* y *A. P. García Gancedo* 45

Estudio con el microscopio electrónico de algunas estirpes de *Pseudomonas savastanoi*, por *R. Beltrá* 61

El aspecto estructural, bioquímico y genético del bacteriófago. Revisión de conjunto (continuación), por *Federico Beato y González* 77

SUMARIO DEL NUM. 2

Del pleomorfismo microbiano en productos patológicos, por *A. Socias* y *A. Portolés* 113

Una nueva variedad de *Torulopsis holmii* (Jorgensen) y estudio de sus productos metabólicos, por *Carlos Ramírez Gómez* y *Gonzalo Sierra Rico* 147

Estudio del «corn steep» y de su influencia en la fermentación alcohólica, por *María Aparicio* 163

Una nueva especie de *Endomyces* Reess: *Endomyces ovetensis* nov. sp., por *Fernando Peláez Campomanes* y *Carlos Ramírez Gómez* 191

El aspecto estructural bioquímico y genético del bacteriófago. Revisión de conjunto (conclusión), por *Federico Beato y González* 201

Renovación de Directiva.—VII Congreso Internacional de Microbiología.—Actas de la Sociedad 237

SUMARIO DEL NUM. 3

Bacterias que atacan la pectina en las plantas jóvenes de *Lycopersicum esculentum* Mill, por *Camilo Torras Casals* 239

Estudio de una variante no proteolítica de *Inflabilis mangenoti*, por *C. González* 269

Nueva especie de levadura, aislada de concentrado de tanino, *Candida majoricensis* nov. sp., por *Rafael Genestar Serra* 275

Fijación del nitrógeno atmosférico por microorganismos distintos de los *Azotobacter, Rhizobium* y *Clostridium*, por *J. Morales* 281

Nueva técnica para la identificación del *Pseudomonas savastanoi*, por *R. Beltrá* 293

Estudio bacteriológico del proceso de curtición de pieles mediante taninos, por *J. Morales* 315

Estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de una especie nueva de *Clostridium: Cl albuminolyticum* nov. sp., por *C. González* 327

Contribución al estudio de la acción de la luz ultravioleta sobre los neumococos, por *A. Guerra Sabater* 333

SUMARIO DEL NUM. 4

Albert Jan Kluyver (†), por *Gonzalo Sierra* 349

Antibiograma para asociaciones de antibióticos, sobre papel de filtro impregnado, en silueta múltiple, por *A Socias* y *A. Portolés* 353

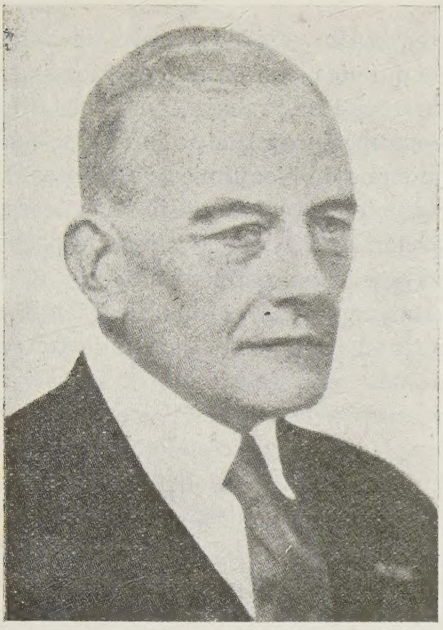
Microscopía electrónica de las formas «L» y filtrables del *Agrobacterium tumefacienes*, por *M. Rubio Huertos* y *P. R. Desjardins* 375

El *Bacillus subtilis* como flora normal del pimentón, por *A. Socias* y *J. Pérez Silva* 383

Acción de la luz ultravioleta sobre los *Rhizobium*, por *Eulalia Cabezas de Herrera* 397

Identificación de bacteriófagos mediante técnicas serológicas. I. Bacteriófagos aislados a partir de heces humanas, por *M. Luisa Alonso* 421

Nueva técnica para la identificación del *Pseudomonas savastanoi* (conclusión), por *R. Beltrá* 433



ALBERT JAN KLUYVER †

Con la pérdida del microbiólogo holandés Albert Jan Kluyver, la Ciencia ha sido privada de uno de sus más entusiastas contribuidores.

Su nombre como microbiólogo se identifica con algunos de los progresos principales de la Bioquímica.

Con ayuda de técnicas bioquímicas estudia las actividades de los micro-organismos, y estos estudios, en reciprocidad, le conducen a algunos de los fundamentos de la Bioquímica. Kluyver demuestra las grandes ventajas que ofrecen los micro-organismos para el estudio de muchos fenómenos bioquímicos y hace que el bioquímico se interese por los microbios. Kluyver ha formado químicos-microbiólogos durante treinta y cinco años de su vida de maestro, y con él, la Universidad Técnica de Delft ha adquirido una reputación mundial como uno de los centros más importantes de investigaciones microbiológicas.

Albert Jan Kluyver nace el año 1888 en Breda (Holanda). Cursa la

enseñanza superior en la Universidad Técnica de Delft, donde en 1910 se gradúa en ingeniería química, con premio extraordinario.

Durante los años 1909-1914 trabaja como asistente del profesor van Iterson, con una interrupción en 1911, año en que marcha a Viena para ampliar sus conocimientos de bioquímica de plantas. De nuevo en Delft, idea un método bioquímico para valoración de azúcares en mezclas. Para ello utiliza la producción de CO_2 por levaduras específicas cuando crecen en anaerobiosis. Con este trabajo obtiene, en 1914, el grado de Doctor en Ciencias, también con premio extraordinario. El mismo año, por necesidades de la primera Guerra Mundial, el joven doctor se incorpora al ejército holandés, donde pasa más de un año.

De nuevo incorporado a la vida civil en 1916, acepta una plaza de asesor industrial en las Indias holandesas. Contrae matrimonio con H. J. van Lutsemburg Maas, hábil colaboradora de van Iterson, y con su joven esposa marcha para las colonias.

En 1919, por especial encargo del Gobierno, realiza un extenso estudio, que publica en 1921, sobre la fibra de coco, de valor industrial en Ceilán y Malabar. En 1920 es nombrado director del laboratorio de investigación de la «N. V. Olienfabriken Insulinda», en Bandoeng.

Un año después le es ofrecida la cátedra de Microbiología de Delft, empleo que, por fin, después de muchas vacilaciones, acepta. La cátedra que en Delft ha de cubrir es la vacante que el reputado microbiólogo Beijerinck ocupó desde 1895 hasta su jubilación en el año 1921. La sucesión no era fácil, y así lo manifiesta Kluyver al exponer su indecisión para aceptar aquel puesto. Arguye que sus limitados conocimientos de microbiología no le permitirían continuar la labor realizada por el ilustre predecesor. Sin embargo, las cualidades apreciadas en el candidato hicieron que las razones de Kluyver no fuesen atendidas por ser conocidas en él: un gran sentido de la responsabilidad, una capacidad de trabajo enorme, amplios conocimientos, habilidad muy fina para la crítica, deseo incesante de perfección y un acentuado interés por la microbiología.

Ya catedrático, comienza una vida de trabajo intenso, se impone en los conocimientos acumulados por la microbiología general, y con un programa propio, en el que manifiesta la tendencia, como idea central de su concepción, de reunir en grupos representativos los diversos procesos bioquímicos que realizan los microorganismos, comienza su vida de maestro.

Para unificar la multiplicidad de procesos, él concibe una generaliza-

ción del concepto expreso de Lavoisier, concluyendo que el mantenimiento de la vida es posible por la energía elaborada por los procesos de transferencia enzimática de hidrógeno de un donador a un aceptador (1).

Aplicaciones posteriores del concepto unitario llevan a Kluyver a la base de la bioquímica comparada. El concepto comprendido en este término es expuesto por Kluyver con el título «Chemical Activities of Microorganisms» en la Universidad de Londres. Toda una serie de posteriores investigaciones en el laboratorio de Kluyver y en otros centros revelan la gran utilidad y armonía que ha reportado el concepto de bioquímica comparada.

En el campo de la microbiología práctica destacan sus aportaciones al estudio del metabolismo de los mohos. Kluyver introduce la técnica de «cultivos sumergidos» para el crecimiento de mohos; con el empleo de esta técnica ha sido posible el estudio del metabolismo de mohos bajo condiciones, cuyos resultados son completamente reproducibles. Varias industrias utilizan su procedimiento; primero la manufactura de riboflavina, más tarde la de penicilina, y después la de otros antibióticos producidos por mohos y actinomicetos.

Unas doscientas publicaciones (2), entre ellas treinta y dos tesis doctorales, testimonian la grandiosa aportación de Kluyver a la microbiología y bioquímica. Muchos asuntos son allí tratados: metabolismo de hidratos de carbono, fermentación metánica, reducción de nitratos, microbiología de alimentos, estudios taxonómicos y de otros muchos temas especializados que sería prolijo enumerar. Dignas de mención son las series de monografías sobre levaduras; en ellas se agota la literatura y se hace un estudio comparativo de la prodigiosa colección de levaduras mantenida en el laboratorio de Delft en colaboración con el «Central Bureau voor Schimmelcultures», de Baarn.

Kluyver se interesa también por problemas de biología general; así lo revela en aquellas conferencias dadas a biólogos en la Harvard University en 1954 (en colaboración con van Niell) con el título «The microbe's contribution to Biology».

En 1937, bajo la dirección del Kluyver y Ornstein, se crea en Utrecht una sección de investigaciones biofísicas patrocinada por la Fundación

(1) El concepto unitario fué expuesto principalmente en dos publicaciones: «Die Einheit und der Biochemie», en 1926, en colaboración con Donker, y en «Eenheid en verscheidenheid in de stofwisseling der microben», en 1924.

(2) La bibliografía completa de las publicaciones de Kluyver ha sido publicada en Chem. Weekblade, 36, 320 (1956).

Rockefeller. De allí salieron varias publicaciones sobre fotosíntesis y sobre bioluminiscencia de bacterias.

Todas estas contribuciones revelan cómo la mente de Kluyver supo esparcirse sobre varios campos, llevado a todos ellos de su gran interés.

Y toda esta prolija actividad no le quitaba tiempo para conocer a cada uno de sus alumnos y colaboradores. En la cátedra y en las relaciones con sus discípulos fué muy particular, original en sus conferencias, claro al exponer y muy famoso por sus muchos y buenos consejos. El gran interés que el maestro toma por el trabajo personal, problemas espirituales y sociales, e incluso deportivos, de sus discípulos sorprendía a quienquiera que trabajó en su laboratorio. La libertad y responsabilidad concedida en la Biblioteca, colección de productos químicos, almacenes de material de vidrio o aparatos, maravillaba de inmediato a todo aquel que llegaba por primera vez al laboratorio de Delft.

Entre sus centenares de nombramientos son de destacar: miembro de las Academias «Koninklijke Nederlanse van Wetenchappen», de la que fué presidente; «Finnish of Sciences, National of Sciences U. S. A.», y de la «Amer. de Arts & Sciences»; miembro honorario de las sociedades «Bacteriólogos Americanos», «Real de Londres» y de la« Británica de Microbiología General». Recibió grados honoríficos del «Iowa State College», «University of Louvain», «Rutgers University» y de la «Eidgenössische Technische Hochschule», de Zürich. Entre otras medallas le fueron adjudicadas la de Emil Christian Hausen, en Copenhague, y la Copley de la «Royal Society», de Londres. Lorentz y Kluyver son los dos únicos holandeses a quienes les fué concedida esta última distinción.

El profesor A. J. Kluyver ha dado una gran contribución a la ciencia y ha dejado además un recuerdo inolvidable para todos aquellos que tuvimos la fortuna de conocerle y de experimentar su influencia beneficiosa.

GONZALO SIERRÁ (*)

(*) Becario del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología del C. S. I. C., en el «Laboratorium voor Microbiologie», Amsterdam.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA

ANTIBIOGRAMA PARA ASOCIACIONES DE ANTIBIOTICOS. SOBRE PAPEL DE FILTRO IMPREGNADO, EN SILUETA MULTIPLE (*)

POR

A. Socias y A. Portolés.

Puesto que ya es patente la evolución de los microorganismos hacia la resistencia para los distintos antibióticos más comúnmente usados, según hemos podido comprobar experimentalmente y por publicaciones más o menos recientes (1, 4, 9, 10, 14), y apoyándonos en la idea de que, con fines clínicos, es absolutamente necesario disponer de un método que sea relativamente cómodo y sencillo para averiguar lo más rápidamente posible la sensibilidad de los gérmenes a las asociaciones de estos agentes terapéuticos. Nos propusimos desarrollar una técnica que permitiera conocer el comportamiento de las diferentes especies bacterianas frente a diferentes asociaciones bivalentes de antibióticos, en un plazo máximo de dieciocho a veinticuatro horas, pudiéndose realizar esta determinación como método de rutina y simultáneamente con las otras investigaciones usuales en el examen bacteriológico de cualquier producto patológico.

Es sabido que la sensibilidad de los microorganismos para antibióticos, sulfamidas y otros medicamentos puede averiguarse rápidamente y con la precisión necesaria a las exigencias del clínico, mediante discos de papel impregnados de estas sustancias, así como también las modificaciones que estas pruebas han sufrido desde Morley (11) y O'Toole (12), primeros en usarlas, hasta las técnicas más recientes (Bondi, Spaulding, Smith y Dietz (2), Gould y Bowie (6), Goldin y David Sohn (7), Fusillo y Kuhns (5), entre las que se encuentran la de los discos múltiples de Scherr (13).

(*) Según la técnica propia, montada en nuestra Sección para la determinación de antibiogramas en los productos patológicos que nos son remitidos.

Sin embargo, para las asociaciones de antibióticos tan sólo se viene usando el método de Chabbert (3) de las diluciones en tubos sembrados, incubado de los mismos y posterior resiembra de tubos problemas y patrones, para hacer las correspondientes comparaciones. Este método, que viene usándose con éxito, precisa de una abundancia de material y gasto de medio de cultivo que para ciertos laboratorios no resulta fácil y, además, requiere un mínimo de cuarenta y ocho horas para conocer los resultados, y lo mismo sucede con el publicado más recientemente por Jawetz y colaboradores (8).

Por ello, nosotros proponemos este método de discos de papel impregnados en silueta múltiple, que permite realizar el antibiograma para asociaciones bivalentes de antibióticos, de un modo fácil, cómodo y rápido, y con la suficiente exactitud exigida para la clínica.

METODOS EXPERIMENTALES Y RESULTADOS

Conocidas las ligeras variaciones que pueden encontrarse para estos métodos sobre papel de filtro impregnado, que depende de la dilución del germen, características del medio, etc., así como también las contradicciones, en cuanto a los resultados, que incluso para una misma especie bacteriana se han encontrado al estudiar *in vitro* la acción antimicrobiana de distintas asociaciones de antibióticos, debido principalmente a la distinta sensibilidad manifestada por el germen a los antibióticos que constituyen la asociación y a los tiempos, dosis y modos de acción de las sustancias, aisladamente consideradas; hemos realizado un examen analítico de los distintos factores que intervienen en esta técnica desde el punto de vista de la consecución de mejora de resultados.

Las *placas* de 15 × 30 cms. son metálicas, con base de cristal, y las tapas perforadas por 48 pequeños agujeros (foto 1).

Los *medios* utilizados son dos: uno, con el que se forma la capa base de unos dos milímetros de espesor (jugo de carne, 50; jugo de hígado, 50; peptona, 2, y agar, 1,2; pH = 7,4); y otro, para hacer una capa de siembra de uno a dos milímetros (caldo Liebig, 1; bactotriptona, 2; suero, 7,5; agar, 1,5; agua, 100). Este último a pH = 7,2 que es con el que hemos obtenido resultados más homologables, ya que está intermedio entre las exigencias de la penicilina (pH óptimo 6,5 — 7), y el de la estreptomicina (pH óptimo 7,6 — 7,8). Se le añade el suero en esa canti-

dad para facilitar el desarrollo de los gérmenes recién aislados del organismo, y no más, porque entorpece ligeramente la acción de la aureomicina.

Los *gérmenes* se siembran preparando una suspensión en solución salina estéril, de forma que este inóculo tenga una concentración de unos 300.000.000/c. c. Se amplean 2 c. c., y cuando se trata de gérmenes de desarrollo pobre, se hacen las suspensiones más concentradas.

Las *condiciones de humedad* de las placas en el momento de colocar las siluetas de papel impregnado tiene bastante influencia en la difusión de los antibióticos y en la correcta formación del halo; por tanto, para evitar que haya una humedad excesiva en la superficie de la placa, se mantendrán de una a dos horas en estufa a 37°, antes de colocar las siluetas, con lo cual se logrará trabajar siempre en condiciones uniformes de humedad. Hemos comprobado que de quince a veinte minutos es poco tiempo, y pasando de dos horas y media es demasiado.

Al describir las *siluetas de papel de filtro* hemos de tener en cuenta: *a)* La calidad del papel, ya que las diferentes clases de papel de filtro ensayadas, que pueden ser agrupadas en tres clases, nos demuestran que los mejores halos se lograban con papel wathmamm núm. 2, y con el de filtro para jarabes; por otra parte, en el primero de los dos y con el de filtro corriente se tiene la dificultad de su manejo y la rapidez de difusión del líquido impregnante, que no se contrarresta con la facilidad de su cortado. *b)* Hemos adoptado la característica de siluetas polivalentes por su fácil manejo y rapidez de colocación sobre las placas, disminuyendo los riesgos de contaminación. *c)* La forma de M (fot. 2) creemos que es la más acertada, porque permite conseguir fácilmente un reparto perfectamente simétrico de los discos de titulación, no siendo necesario, además, marcarlos ni ponerlos señal alguna, ya que empezando por el extremo inferior izquierdo y siguiendo el trazo normal de una *eme mayúscula* se logran situar en todo momento los tubos con sus diluciones, según se indica en el esquema correspondiente (fot. 3). *d)* El tamaño es el que resulta de una silueta inscrita en un cuadrado que tiene 60 mm. de lado, con lo que se pueden colocar por placa tres siluetas, perfectamente distanciadas, y sin que haya confusión de halos. *e)* Los discos de titulación, de 10 mm. de diámetro, están diseñados sobre las ramas de la M, de modo que permitan medir perfectamente los diámetros de los halos (fot. 4), y los segmentos de unión entre ellos, tienen un ensanchamiento central para hacer a las siluetas más manejables y sin riesgo de roturas.

Las *diluciones de antibióticos* utilizadas se corresponden a dos grupos: las de los ensayos experimentales y las de la técnica propiamente dicha, que se describirán más adelante. Para los ensayos tan sólo hemos trabajado con los cuatro antibióticos más característicos en cuanto a estructura química y propiedades: penicilina, dihidroestreptomicina, cloromicetina y terramicina.

Con ellos y agua destilada estéril se preparan soluciones madres a las concentraciones siguientes:

Penicilina ... ... = 800 U. O./cc.
Dihidroestreptomicina ... ... = 2.000 γ/cc.
Cloromicetina ... ... = 2.000 γ/cc.
Terramicina... ... ... = 2.000 γ/cc.

y con ellas se establecen las asociaciones bivalentes de antibióticos a las diluciones que se indican:

ESQUEMA DE LAS DILUCIONES

ANTIBIÓTICOS	TUBOS 1	2	3	4	5	
Penicilina...	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	—	—	Dilución A.
Dihidroestrep.	1 c. c.	—	—	1 c. c.	1 c. c.	
Cloromicetina... ...	—	1 c. c.	—	1 c. c.	—	
Terramicina	—	—	1 c. c.	—	1 c. c.	

TUBOS	6	7	8	9	10	
Dilución A	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	Dilución B.
Agua destilada.. ...	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c	

TUBOS	11	12	13	14	15	
Dilución B	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	Dilución C.
Agua destilada.. ...	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	

TUBOS	16	17	18	19	20	
Dilución C	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	Dilución D.
Agua destilada.. ...	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	

CONCENTRACIONES QUE SE OBTIENEN EN CADA TUBO

1	2	3	4	5
400 U. O. penicil.	400 U. O. penicil.	400 U. O. penicil.	200 gam. estrep	200 gam. estrep.
200 gam. estrep	200 gam. clorom.	200 gam. terram.	200 gam. clorom.	200 gam. terram.

6	7	8	9	10
200 U. O. penicil.	200 U. O. penicil.	200 U. O. penicil.	100 gam. estrep.	100 gam. estrep.
100 gam. estrep.	100 gam. clorom.	100 gam. terram.	100 gam. clorom.	100 gam. terram.

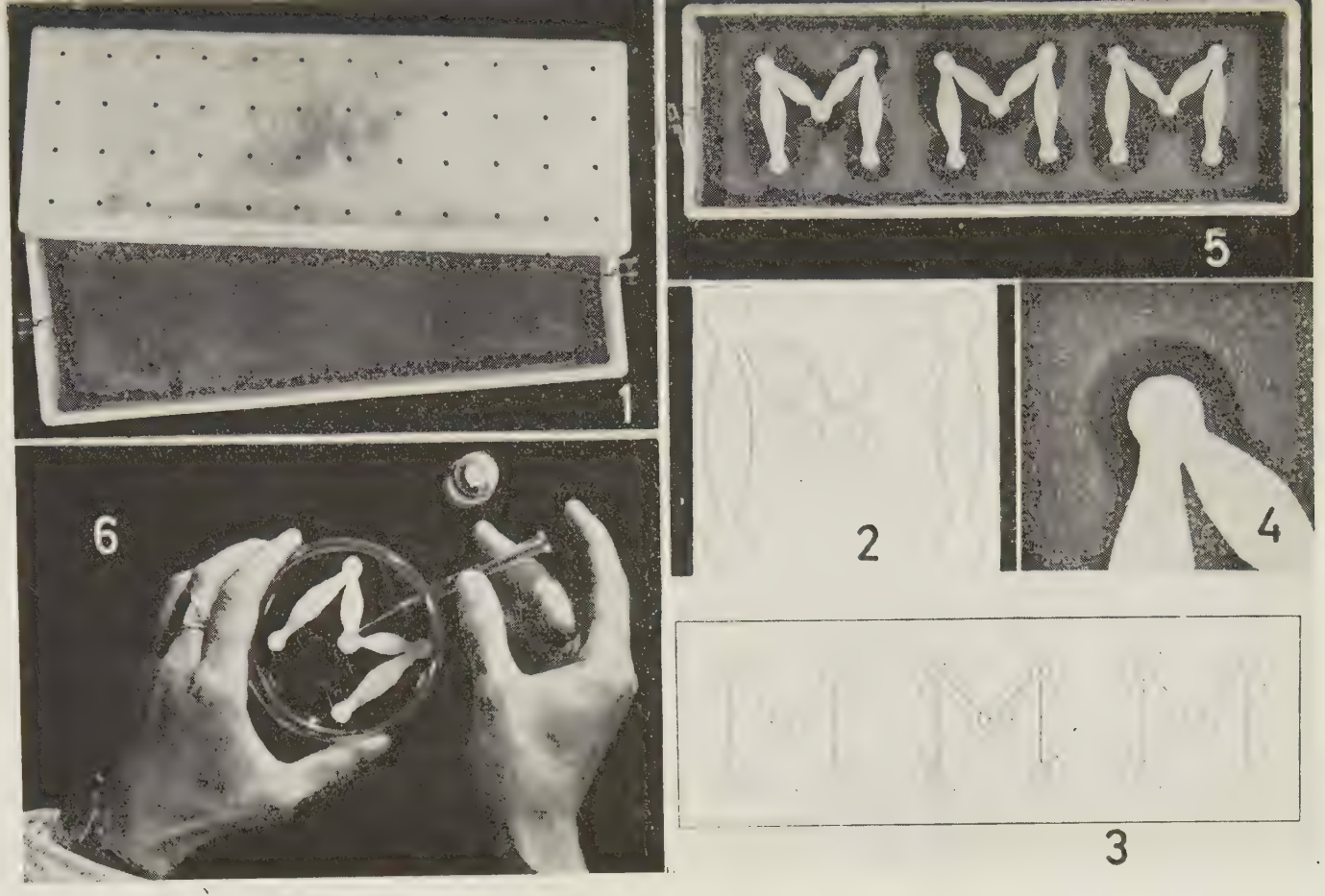
11	12	13	14	15
100 U. O. penicil.	100 U. O. penicil.	100 U. O. penicil.	50 gam. estrep.	50 gam. estrep.
50 gam. estrep.	50 gam. clorom.	50 gam. terram.	50 gam. clorom.	50 gam. terram.

16	17	18	19	20
50 U. O. penicil.	50 U. O. penicil.	50 U. O. penicil.	25 gam. estrep.	25 gam. estrep.
25 gam. estrep.	25 gam. clorom.	25 gam. terram.	25 gam. clorom.	25 gam. terram.

De estas diluciones a cada disco correspondiente, se le añade 0,02 c. c. ó 0,01 c. c. (según el ensayo), mediante una jeringuilla de 0,25 c. c., como las utilizadas corrientemente para inoculaciones de virus en cerebro de ratón, y provista de una aguja 25 — 5 b. c., con lo cual los discos de titulación llevan las concentraciones que se indican en el cuadro a continuación:

CONCENTRACIONES DE ANTIBIÓTICOS POR DISCO

Serie A	Tubos	1	2	3	4	5
	Concentraciones de antibióticos...	4 U. O. Penicil. 10 gam. Estrep.	4 U. O. Penicil. 10 gam. Clorom.	4 U. O. Penicil. 10 gam. Terram.	10 gam. Estrep. 10 gam. Clorom.	10 gam. Estrep. 10 gam. Terram.
Serie B	Tubos	6	7	8	9	10
	Concentraciones de antibióticos...	2 U. O. Penicil. 5 gam. Estrep.	2 U. O. Penicil. 5 gam. Clorom.	2 U. O. Penicil. 5 gam. Terram.	5 gam. Estrep. 5 gam. Clorom.	5 gam. Estrep. 5 gam. Terram.
Serie C	Tubos	11	12	13	14	15
	Concentraciones de antibióticos...	1 U. O. Penicil. 2,5 gam. Estrep.	1 U. O. Penicil. 2,5 gam. Clorom.	1 U. O. Penicil. 2,5 gam. Terram.	2,5 gam. Estrep. 2,5 gam. Clorom.	2,5 gam. Estrep. 2,5 gam. Terram.
Serie D	Tubos	16	17	18	19	20
	Concentraciones de antibióticos...	0,5 U. O. Penicil. 1,25 gam. Estrep.	0,5 U. O. Penicil. 1,25 gam. Clorom.	0,5 U. O. Penicil. 1,25 gam. Terram.	1,25 gam. Estrep. 1,25 gam. Clorom.	1,25 gam. Estrep. 1,25 gam. Terram.



Fotos 1-6.

Para la *preparación de los discos*, una vez cortadas las siluetas de papel, hay que colocarlas en placas de Petri y esterilizarlas a calor seco (160° a 170°) durante una hora. La esterilización húmeda no conviene porque influye en la difusión (fot. 5), haciendo que se confundan los halos.

Después de frías, se añaden las mezclas de antibióticos lo más estérilmente posible (fot. 6), y siguiendo el orden de los tubos. A continuación se llevan a desecador de vacío con $P_2 O_5$, donde a una temperatura de 18° se secan perfectamente en tres a cuatro horas, al cabo de las cuales pueden utilizarse o guardarse en nevera para usarlas más tarde.

Para las *pruebas de antibiogramas* se colocan cuidadosamente y con la máxima rapidez sobre la capa de medio sembrado, después de haber tenido estas placas durante noventa minutos en estufa a 37°.

Las *lecturas de resultados* pueden hacerse normalmente a las quince o dieciséis horas, aunque para algunas especies del género *Corynebacterium* y otras de crecimiento pobre, hemos comprobado resulta conveniente hacer esta lectura a las dieciocho a veinte horas, distinguiendo así perfectamente los halos, de los que habrá de medirse el diámetro precisamente.

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

En los numerosos ensayos efectuados para el mejor desarrollo de la técnica hemos ido comprobando las ventajas o inconvenientes derivados de las diferentes maneras de operar; de sus resultados se deducen:

a) Es ventajoso disponer los discos perfectamente secos, porque si no la difusión viene aumentada, llegando incluso a confundirse los halos entre sí (fot. 7); este mismo problema se tiene si la superficie de la placa tiene demasiada humedad. De aquí la necesidad de su desecación en estufa de una a dos horas.

b) Resulta conveniente que las cantidades con que se impregnan los discos (fot. 8) no pasen de 0,02 c. c. (derecha), ya que si no, no se puede evitar la confusión de halos (izquierda); esto mismo sucede si se añaden los antibióticos sobre las siluetas ya montadas en la placa (centro).

c) Se recomienda dar una ligera curvatura a los segmentos de la M para obtener imágenes más claras y definidas.

d) Untilizando las diluciones de las series A, B y C no se observa apenas diferencia en el tamaño de los halos, cuando se emplean cantidades

de 0,02 c. c. para cada disco (fot. 9); es decir, que para concentraciones comprendidas entre 1 — 4 U. O./c. c. de penicilina y 2,5 — 10 gamas/c. c. de los otros antibióticos, influye más en la disminución del halo la cantidad de líquido añadido que la concentración efectiva del antibiótico, por lo que definitivamente se establece 0,01 c. c. de líquido, exactamente medido, para cada disco.

e) Utilizando las diluciones de las cuatro series A, B, C y D para la cantidad de 0,01 c. c. por disco (fots. 10 y 11), se obtuvieron los resultados siguientes:

DIÁMETROS COMPARATIVOS DE LAS ZONAS DE INHIBICIÓN, EN MM., CON LOS DISCOS IMPREGNADOS POR LAS DIFERENTES ASOCIACIONES Y CONCENTRACIONES

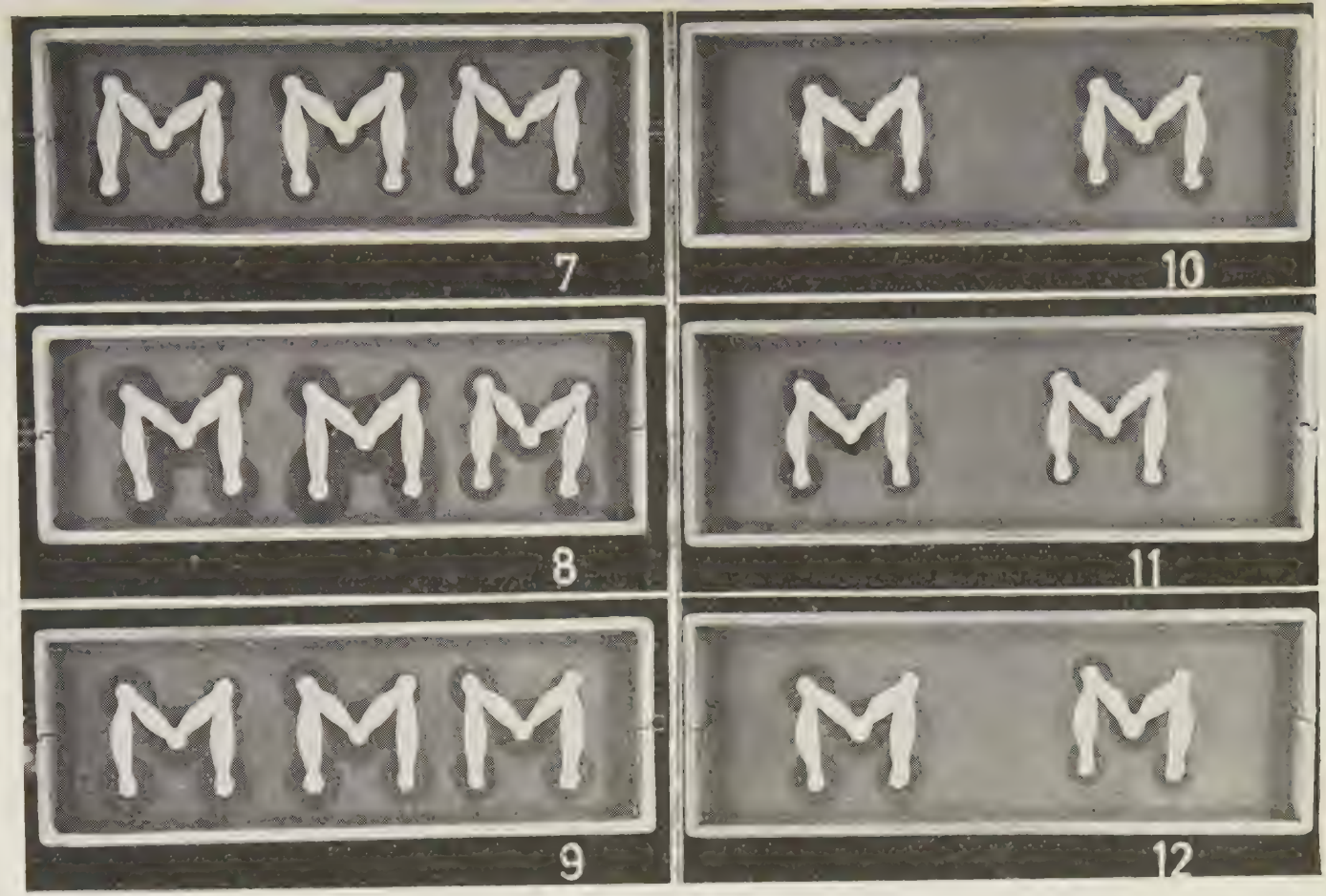
ASOCIACIONES BIVALENTES DE ANTIBIÓTICOS	CONCENTRACIONES			
	A 4 U. O./cc. 10 gam./cc.	B 2 U. O./cc. 5 gam./cc.	C 1 U. O./cc. 2,5 gam./cc.	D 0,5 U. O./cc. 1,25 gam./cc.
Penicil. + Estrep.	29	26	25	17
Penicil. + Clorom. ...	28	26	25	20
Penicil. + Terram. ...	30	26	25	23
Estrep. + Clorom.	14	13	0	0
Estrep. + Terram. ...	25	24	20	20

De aquí que se eligieran las concentraciones tipo A y C para utilizarlas en la técnica, como diluciones límites entre las que puede fijarse la sensibilidad de una cepa bacteriana, ya que en ellas se pueden apreciar bien las diferencias en el tamaño y aparición de los halos, como puede verse en la foto 12 que corresponde a estas concentraciones.

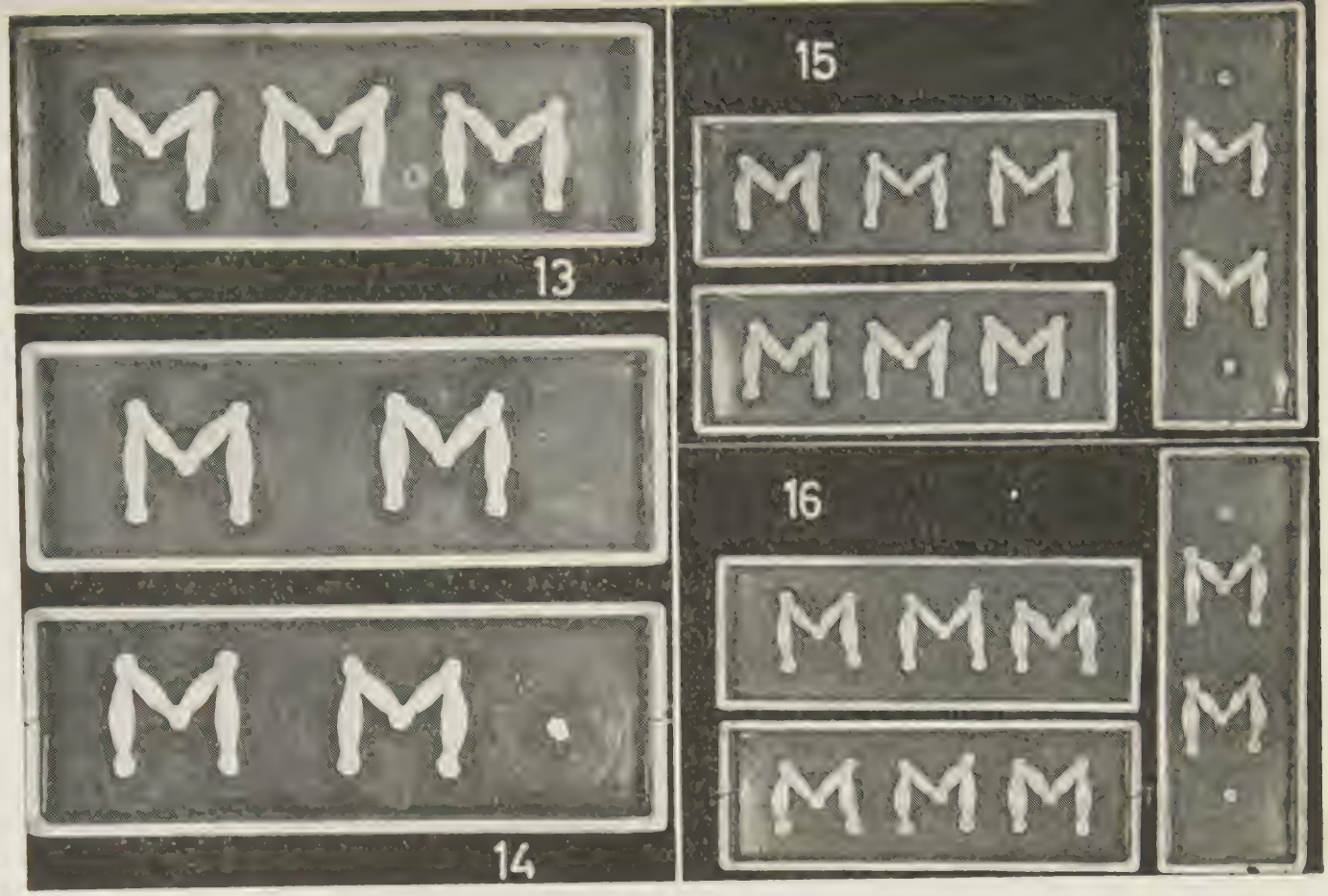
f) Es preferible realizar la preparación de las siluetas impregnadas de un modo extemporáneo y mantenerlas guardadas, bien secas y a baja temperatura.

g) Las diluciones mezcladas conservan su actividad a 2° — 0° durante diez a doce días (fot. 13), y las siluetas desecadas y mantenidas a estas temperaturas pueden usarse durante treinta-cuarenta días (fot. 14).

De todos estos ensayos, cuya realización y resultados hemos indicado anteriormente, hemos desarrollado la técnica que exponemos a continuación, y con la cual hemos obtenido buenos resultados para los distintos gérmenes y productos patológicos examinados.



Fotos 7-12



Fotos 13-16

DESARROLLO DE LA TECNICA

En ella se pueden diferenciar las fases que a continuación iremos describiendo:

a) *Preparación de los papeles impregnados.* Una vez cortadas las siluetas y esterilizadas tal como se dijo anteriormente (a 165° durante una hora en horno Pasteur), se impregnan con 0,01 de cada tubo de las dos series de diluciones, y se desecan a vacío, sobre P_2O_5, y a la temperatura de 18°.

Los tubos de diluciones se preparan a partir de *soluciones madre* que contienen una concentración de antibiótico determinada, mezclándolas en el orden y cantidades que se indicarán seguidamente.

Características de los antibióticos usados

MARCAS Y CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO	POTENCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS EMPLEADOS	CONCENTRACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRES
Penicilina G. sólida cristalizada. Merck	1.667 O. U./mgr.	800 U. O./c. c.
Dihidroestreptomicina, sulfato. Merck	800 gam./mgr.	2.000 gam./c. c.
Chloramfenicol micromizado. Parke Davis	1.000 gam./mgr.	2.000 gam./c. c.
Aureomicina, clorhidrato. Lederle	1.000 gam./mgr.	2.000 gam./c. c.
Terramicina, clorhidrato. Pfizer	925 gam./mgr.	2.000 gam./c. c.
Tetracilina, base pura. Bristol	980 gam./mgr.	2.000 gam./c. c.

ESQUEMA DE LOS

ANTIBIÓTICOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Penicilina...	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	—	—	—	—
Dihidroestrep.	1 cc.	—	—	—	—	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
Cloromicetina.. ...	—	1 cc.	—	—	—	1 cc.	—	—	—
Auremicina	—	—	1 cc.	—	—	—	1 cc.	—	—
Terramicina	—	—	—	1 cc.	—	—	—	1 cc.	—
Tetracilina...	—	—	—	—	1 cc.	—	—	—	1 cc.
Agua dest. est. ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diluciones de la concentración A.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Agua dest. est. ...	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

De cada uno de estos 42 tubos se colocan 0,01 c. c. de líquido sobre cada disco, con lo cual se necesitan tres siluetas para las asociaciones que van montadas sobre una placa cuadrada, y otra silueta mas un disco para los antibióticos aislados. Todo se dispone sobre tres placas, de modo que el dignóstico de la sensibilidad para asociaciones bivalentes de anti-

TUBOS DE DILUCION

10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Concentración A
—	—	—	—	—	—	1 cc.	—	—	—	—	—	
—	—	—	—	—	—	—	1 cc.	—	—	—	—	
1 cc.	1 cc.	1 cc.	—	—	—	—	—	1 cc.	—	—	—	
1 cc.	—	—	1 cc.	1 cc.	—	—	—	—	1 cc.	—	—	
—	1 cc.	—	1 cc.	—	1 cc.	—	—	—	—	1 cc.	—	
—	—	1 cc.	—	1 cc.	1 cc.	—	—	—	—	—	1 cc.	
—	—	—	—	—	—	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	

10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Concentración B
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	

bióticos, de un producto patológico o germen determinado, se realiza tal y como se puede apreciar en la fotos 15 y 16, correspondientes a un micrococo Gram positivo y un bacilo Gran negativo, respectivamente, y y cuyo antibiograma—que no interpretaremos porque sólo le indicamos como ejemplo—es el que se indica:

ASOCIACIONES BIVALENTES ENSAYADAS	DIÁMETRO EN MM. DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN			
	Micrococo Gram positivo		Bacilo Gram negativo	
	Dilución A	Dilución B	Dilución A	Dilución B
Penicil. + Estrep.	25	24	0	0
Penicil. + Clorom.	30	23	24	12
Penicil. + Aureom.	30	23	0	0
Penicil. + Terram.	26	25	0	0
Penicil. + Tetrac.	27	23	0	0
Estrep. + Clorom.	17	12	20	0
Estrep. + Aureom.	18	15	0	0
Estrep. + Terram.	23	18	0	0
Estrep. + Tetrac.	26	16	0	0
Clorom. + Aureom.	23	16	19	16
Clorom. + Terram.	24	17	19	15
Clorom. + Tetrac.	22	18	21	12
Aureom. + Terram.	24	18	0	0
Aureom. + Tetrac.	22	17	0	0
Terram. + Tetrac.	25	19	0	0
Penicilina	28	18	0	0
Estreptomicina	0	0	0	0
Cloromicetina	18	11	18	16
Aureomicina	16	13	0	0
Terramicina	20	13	0	0
Tetraciclina	23	21	0	0

Como puede verse, la proporcionalidad entre los halos y las concentraciones varía para cada asociación de antibióticos.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La técnica anteriormente descrita, que si bien no da la tasa de sensibilidad absoluta, permite, sin embargo, establecer qué asociación de antibióticos es la más eficaz para un germen de una determinada resistencia al tratamiento por antibióticos, ya que éste será inhibido más o menos según su sensibilidad a la asociación.

Esta interpretación de resultados podrá hacerse con respecto a dos puntos de vista:

a) Considerando a la asociación como antibiótico complejo, cuya eficacia se desea conocer, frente al germen o gérmenes que se investigan, se puede usar de la pauta que indicamos a continuación.

DILUCIÓN A		DILUCIÓN B		CALIFICACIÓN ASIGNADA AL GERMEN QUE SE INVESTIGA
Halo en mm.	REPRESENTACIÓN	Halo en mm.	REPRESENTACIÓN	
Más de 25	+ + +	De 25 a 20	+ +	Muy sensible.
De 25 a 20	+ +	De 19 a 12	+	Sensible.
De 19 a 12	+	Menos de 12	±	Moderadamente resistente.
Menos de 12	±	Ninguno	—	Resistente.
Ninguno	—	Ninguno	—	Muy resistente.

b) Considerando aisladamente los antibióticos, para ver cuál de ellos potencializa mejor la acción de los otros, así podremos hablar de que una asociación presenta *sinergismo* cuando los halos correspondientes a esta asociación tienen mayor diámetro que los obtenidos para cada uno de los antibióticos que la forman, cuando se utilizan por separado. La asociación es *indiferente* cuando los halos con ella obtenidos son iguales a los de la sustancia más activa de las utilizadas aisladamente. Y, por último, hay *antagonismo* cuando los halos de la asociación son menores que los del antibiótico más activo de los usados separadamente.

CONCLUSIONES

Aplicada esta técnica para más de un centenar de exámenes bacteriológicos, se han comprobado las ventajas de la forma y disposición de las siluetas, evitando las confusiones, a pesar de ser 42 las diluciones que intervienen, así como también su manejabilidad y rapidez de colocación.

Con el uso de estos discos múltiples se reduce el tiempo y el trabajo, así como las posibilidades de contaminación, ya que la operación de implantar tales siluetas reduce en cinco veces la labor de los discos con-

vencionales, y con relación a los métodos de dilución se consiguen los resultados en la mitad de tiempo.

Las relaciones de difusión de las distintas asociaciones en el medio son más uniformes, y, por tanto, se hace mejor la comparación de resultados.

Estudiada la técnica sobre gérmenes aislados de infecciones del aparato génito-urinario y sobre diferentes productos patológicos, se obtuvieron resultados que permiten afirmar se trata de un método que, aun con los inconvenientes apropiados a estas técnicas de tantas variables, se puede considerar altamente satisfactoria como investigación de rutina, pudiéndose señalar por este procedimiento el tratamiento antibiótico más activo en el menor tiempo posible, a la vez que, si no esquemas fijos, sí indicar el sentido del sinergismo o antagonismo de las diferentes asociaciones bivalentes.

Usando las dos concentraciones establecidas, se puede obtener una relativa idea del estado cuantitativo de la resistencia o sensibilidad a las asociaciones que se ensayan.

RESUMEN

Se describe un nuevo tipo de discos de papel impregnado, para determinar la sensibilidad bacteriana a diferentes asociaciones bivalentes de antibióticos.

Estos discos se han proyectado en silueta múltiple, para sobre una misma pieza de papel ensayar cinco asociaciones distintas.

Las ventajas de estas técnicas son discutidas e ilustradas.

SUMMARY

In this paper, a new type of paper-impregnated disc for determining bacterial sensivity to diferents bivalents associations of antibiotics is described.

These discs are projected in multiple siluete, on the same piece of paper, to impregnate five different association.

The advantages of this technique are discussed and illustrated.

BIBLIOGRAFIA

(1) Barber y Rozwadowska-Dowzenko. Lancet 2, 641 (1948).
(2) Bondi, Spaulding, Smith y Dietz. Am. J. Med. Sci., 213, 221 (1947).
(3) Chabbert.
(4) Davison. Laryngoscope, 60, 131 (1950).
(5) Fusillo y Kuhns. Med. Techn. Bull., 3, 7 (1952).
(6) Goyld y Bowie. Edinburgh Med. J., 59, 178 (1952).
(7) Goldin y Sohn. Modern. Hospital, 82, 92 (1954).
(8) Jawetz, Gunnison, Coleman y Kempe. Am. J. Clin. Pathol., 25, 1016 (1955).
(9) Mayr-Harting. The Jour. of Gen. Microb., 13, 9 (1955).
(10) Miller y Sherlock-Hubbard. Can. J. Pub. Healt, 43, 35 (1952).
(11) Morley. J. Path. Bact., 57, 379 (1945).
(12) O'Toole. Am. J. Med. Tech., 12. 251 (1946).
(13) Scherr. Antibiot & Chemot., 4, 1007 (1954).
(14) Terrial Chabbert. Ann. Inst. Pasteur, 88, 777 (1955).

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA DE MADRID

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LAS FORMAS «L» Y FILTRABLES DEL *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

POR

M. Rubio Huertos (*) y P. R. Desjardins (**)

INTRODUCCION

Desde el descubrimientos de las formas «L» por Klieneberger-Nobel (3) se ha comprobado que gran número de especies bacterianas se reproducen, bajo especiales circunstancias, por medio del llamado ciclo «L», con sus diferentes fases pleomórficas, una de las cuales, la fase filtrable, recientemente demostrada, ha venido a añadir interés al estudio de esta forma de reproducción en las bacterias. La obtención, observación al microscopio electrónico y descripción de las formaciones «L» y filtrables en el *Agrobacterium tumefaciens* y una discusión sobre el papel que puedan jugar estas formas en la producción de tumores, constituye el objeto de este trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Hemos empleado la estirpe B 38 del *A. tumefaciens* que nos fué amablemente cedida por el doctor D. E. Munnecke, del «Dept. of Plant Pathology. University of California. Los Angeles», el cual probó la patogeneidad de la misma. Como medio de cultivo, al principio, empleamos agar, patata, dextrosa que va muy bien para la bacteria normal, pero para la obtención de las formas «L» nos dió mejor resultado el agar caldo corriente, empleándolo siempre en tubo inclinado. La inducción de las

(*) Becario del «Institute of International Education» en U. S. A.

(**) Department of Plant Pathology. University of California. Riverside (California) U. S. A.

formas «L» a partir de un cultivo normal, la realizamos por medio de soluciones de glicina añadidas al medio de cultivo una vez inoculado con la bacteria. Empleamos soluciones de 5 a 1 por 100 en agua destilada, esterilizando dichas soluciones en autoclave a 120° C. durante media hora.

Para seguir la marcha del paso de formas normales a formas «L» tomamos muestras a diferentes intervalos, haciendo examen con el microscopio óptico por medio de tinciones simples (violeta de genciana, fuchsina), algunas veces tinción de Gram y observaciones en gota pendiente. Las preparaciones para el microscopio electrónico fueron hechas suspendiendo las bacterias normales o las formas «L» en agua destilada y depositando una gota de la suspensión sobre la rejilla-porta del microscopio electrónico recubierta con un film de parlodion; se dejaron secar al aire (desecamos algunas al vacío, congelando con nieve carbónica) y se sombrearon con paladio a un ángulo de 23-24°. Algunas de las preparaciones fueron hechas depositando el espécimen por medio de la técnica de Hartman y colaboradores (2) de dispersión en capa monomolecular de proteína.

Hemos empleado un microscopio electrónico R. C. A. de 50 y 100 Kv., modelo 1956, del laboratorio de la «Citrus Experimental Station. University of California. Riverside».

RESULTADOS

A la media hora de haber sido sembrados con el *A. tumefaciens* los tubos de agar caldo inclinados, les añadimos una solución estéril de glicina al 1 por 100, a unos, y al 5 por 100, a otros, poniéndoles en estufa a 25° C.

A las veinticuatro horas, en los tubos que habían recibido la solución de glicina al 5 por 100, el crecimiento había sido inhibido por completo. En los tubos que recibieron una solución al 1 por 100 se pudo apreciar el crecimiento de colonias muy pequeñas, transparentes y redondas, muy abundantes, y en la parte superior del tubo, es decir, en el lugar del medio de cultivo más alejado de la solución de glicina, algunas colonias blanquecinas.

La observación en el microscopio óptico de preparaciones de las distintas colonias en tinciones simples, nos mostró que las colonias transparentes estaban formadas, en su mayor parte, por formas intermedias, es decir, las de paso entre forma normal y forma «L» redonda o cuerpo

globoso, encontrando también alguna forma normal y alguna forma redonda, y que las colonias blanquecinas estaban formadas exclusivamente por formas normales.

A las cuarenta y ocho horas pudimos observar que en las colonias transparentes no aparecían ya formas normales, y que, al lado de alguna forma intermedia predominaba la forma redonda o globosa, muy grande con respecto al tamaño normal de la bacteria.

Desde los cuatro a los ocho días se ven aparecer, hasta predominar totalmente, formas granulares muy pequeñas, que a veces son casi imposibles de distinguir.

Al mismo tiempo que estas observaciones con tinciones, se hicieron otras en gota pendiente y al microscopio electrónico; del conjunto de estas observaciones, principalmente de las del microscopio electrónico, nos hemos valido para explicar la morfología de las diferentes formas.

Formas intermedias: la de paso desde la forma normal a la forma «L» madura, se producen como en otras bacterias estudiadas anteriormente (7, 8), es decir, por abultamientos polares o laterales de la forma normal (fig. 1, A, B), habiendo encontrado, además, una forma no observada anteriormente, con dos abultamientos polares como en ramificación (fig. 1, C). Estas formas conducen a la forma redondeada, esférica mejor dicho (formas «L» intermedias), con un núcleo central opaco a los electrones y a veces con flagelos (fig. 1, D). Estas formos tienen una membrana bien definida; de aquí, y por fragmentación de la parte central en pequeños gránulos, se pasa a una forma globosa de mayor tamaño, más transparente a los electrones, y que se tiñe menos con los colorantes corrientes (fig. 1, E). Por lisis o rotura de la fina membrana de estas formas quedan en libertad los pequeños gránulos que constituyen las formas filtrables (fig. 1, F).

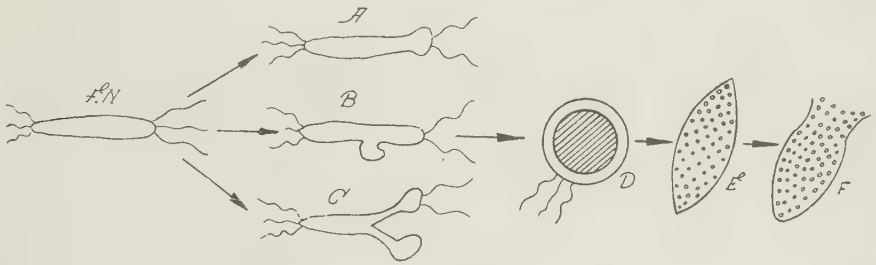


FIG. 1.

DISCUSION

Como hemos visto, los resultados obtenidos por inducción con glicina apenas difieren de aquellos hallados trabajando con otras bacterias (7), especialmente con aquellas más afines, según la reciente clasificación del «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», como son el género *Rhizobium*. La formación sigue los mismos pasos, y, además, en este caso hemos podido observar con mayor claridad en las microfotografías con el microscopio alectrónico la presencia de las formas filtrables dentro de los cuerpos «L» grandes, así como su liberación por lisis de los mismos.

También nuestras observaciones vienen a confirmar las realizadas por Levine (4) en 1925, también en el *A. tumefaciens*, en que vió cómo de la forma bacilar pasaba a una forma lenticular que a veces daba diminutos cuerpos esféricos, y que resembradas estas formas lenticulares en un medio estéril regeneraban la forma bacilar. Levine interpretó la aparición de cuerpos lenticulares como formación de esporas, como sabemos ahora, equivocadamente, y más tarde en sus numerosos trabajos sobre el *A. tumefaciens* no volvió a mencionar estas observaciones.

En el mes de enero de 1955 uno de los autores (7) demostró por microscopía electrónica la presencia de una membrana en las formas «L» («Large bodies») producidas por *Proteus vulgaris, Rhizobium* y *Pseudomonas fluorescens*. En agosto del mismo año, Stempen (9), observando las formas «L» de *Proteus vulgaris,* vino a confirmar la presencia de dicha membrana en estas formas por medio de tinciones específicas y con el microscopio de contrastes de fases. Radler y Rippel-Baldes, en un reciente trabajo (6), también sobre *Proteus vulgaris,* dicen, por el contrario, que las formas «L» no poseen dicha membrana, y que son, las por ellos llamadas formas de involución, las que poseen una membrana posiblemente doble.

Las observaciones realizadas por nosotros en el presente trabajo, muestran claramente la presencia de una membrana en las formas «L» en diferentes estados del ciclo. Así, en las formas globosas («L» intermedias) de núcleo compacto, esta membrana aparece similar a la que posee la célula bacteriana normal (fig. 2, 3), haciéndose más fina y elástica en las formas «L» grandes, en las cuales el núcleo se encuentra dividido en gránulos (fig. 3, 5). En algunos casos esta membrana se abre por uno de sus lados o se lisa totalmente, liberándose las formas filtrables (fig. 6). Por

tanto, creemos que la aserción de Radler y Rippel-Baldes de que las formas «L» no poseen membrana, y sí la tienen las formas de involución, es más bien una cuestión de vocabulario.

La presencia de una forma filtrable en el *A. tumefáciens* es de un especial interés, pues podría explicar algunos de los hechos tan oscuros que existen en la génesis de los tumores secundarios, en los cuales no se encuentran bacterias (se consideran estériles), y cuya formación se ha interpretado, sin llegar a nada conclusivo, de distintas formas, principalmente como inducidos por productos del metabolismo de las bacterias) en especial sustancias de tipo hormonal de crecimiento, actuando en el tumor primario.

Si pensamos que las formas filtrables pueden ser fácilmente llevadas por la corriente circulatoria, e incluso que puedan pasar de una célula a otra a través de los plasmodesmos, podemos imaginar la formación de tumores secundarios como causados por estas formas que no volverían a la forma normal, y que, por lo tanto, serían invisibles en los exámenes con microscopio corriente y de muy difícil cultivo en los medios que han sido empleados hasta ahora para comprobar la presencia de microorganismos en dichos tumores secundarios.

Damos las gracias al doctor D. E. Munnecke, del «Dept. of Plant Pathology. U. of California», Los Angeles, por cedernos los cultivos de *A. tumefaciens*. Al doctor R. W. Woods, «College of Medical Evangelists», Loma Linda, California, cuyo aparato de sombreado para el microscopio electrónico nos dejó amablemente usar para todas nuestras preparaciones, y al señor C. T. Lange por su asistencia técnica.

RESUMEN

Se describen las formas «L» y filtrables de *Agrobacterium tumefaciens* inducidas por solución de glicina al 1 por 100, habiéndose obtenido microfotografías electrónicas de las mismas.

Se discute la posibilidad de que las formas filtrables jueguen un papel en la formación de tumores secundarios.

SUMMARY

The «L» and filterable forms of *Agrobacterium tumefaciens* induced by 1 por 100 glycine solution are described and Electron micrographs of these forms are shown.

The possibility of a role played by the filterable forms in the formation of secundary tumors is discussed.

BIBLIOGRAFIA

(1) De Ropp, R. S.; 1951. The crow gall problem. Bot. Rev. 17; 629-670.

(2) Hartman, R. E.; Green, T. D.; Bateman, J. B.; Senseney, C. A., and Hess, G. E.; 1953. Preparation of uniformy dispersed specimens of particulate matter for electron microscopy. Jour. Appl. Physics, 24 (1); 90-92.

(3) Klieneberger-Nobel; 1936. Further studies on *Streptobacillus moniliformis* and its symbiont. J. Path. Bact., 40: 93-105.

(4) Levine, M.; 1925. Morfological changes in *Bact. tumefaciens*. Science, 62: 424.

(5) Linck, S. K.; 1955. The etiology of crown-gall. Amer. Rev. Biol. 30: 207-275.

(6) Radler, F., y Rippel-Baldes, A.; 1956. Untersuchungen über Wachstumserscheinungen von *Proteus vulgaris* Hauser unter dem Einfluss hoher Penicillinkonzentration. Archiv. für Mikrobiologie. 1956, 23: 400-412.

(7) Rubio Huertos, M. Kuster, E. y Flaig, W.; 1955. Licht und electronenmikroskopische untersuchungen an L-formen bei *Pseudomonas fluorescens*, *B. proteus* und *Rhizobium*. Zentbtt für Bakt. 1 orig. 162; 24-31.

(8) Rubio Huertos, M. Estudio del ciclo «L» y formas filtrables de las bacterias. Publicaciones del C. S. I. C. (Madrid) (en prensa).

(9) Stempen, H.; 1955. Demostration of a cell wall in the large bodies of *Proteus vulgaris*. J. of Bact. 70: 177-181.

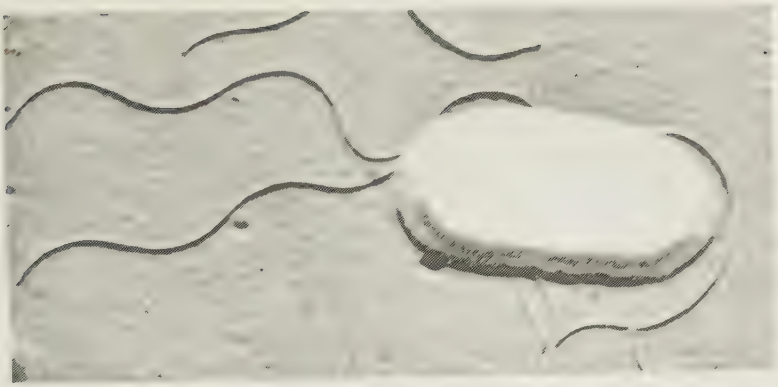


FIG. 2.
Forma normal. Cultivo de 26 horas depositado por capa monomolecular de proteína. 50 kv. — X 21.600.

FIG. 3.
A la izquierda, una forma intermedia de núcleo compacto y flagejo; a la derecha, forma «L» grande con gránulos dentro. Depositada por gota. 100 kv. — X 15.000.

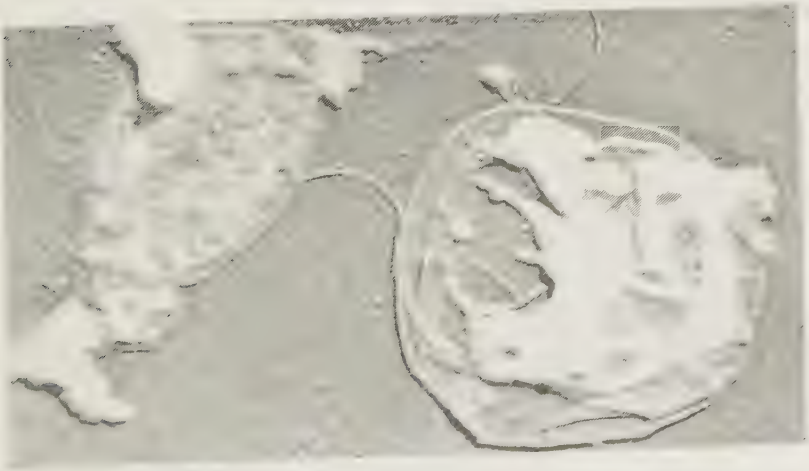


FIG. 4.
Dos formas «L» grandes mostrando gránulos (formas filtrables) dentro. Depositado por gota. 100 kv. — X 18.940.

FIG. 5.
Forma intermedia con flagelos. Depositado por gota. 100 kv. — X 30.000.

FIG. 6.
Formas filtrables liberándose por lisis de la forma «L» grande. Depositado por gota; desecado al vacío, congelando con nieve carbónica. 100 kv. — X 22.350.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA

EL *BACILLUS SUBTILIS* COMO FLORA NORMAL DEL PIMENTON

POR

A. Socias y J. Pérez Silva.

Al verificar el análisis microbiológico de unas aceitunas aliñadas en conserva, las cuales sufrían una cierta alteración al cabo de algún tiempo de ser envasadas, encontramos en gran cantidad un bacilo aerobio, Gram-positivo, productor de endosporos y, por consiguiente, perteneciente al género *Bacillus*.

Con ánimos de averiguar la procedencia de este microorganismo emprendimos una serie de análisis, ocupándonos primeramente de las aceitunas antes de ser aliñadas, en éstas sólo encontramos levaduras y *Lactobacillus*; este resultado nos hizo pensar que el microorganismo en cuestión era introducido al añadir el aliño. En efecto, cuando realizamos el análisis del aliño encontramos en abundancia el bacilo, aunque además existían otros microorganismos, principalmente mohos y levaduras, pero en cantidad insignificante.

Como el aliño a que nos referimos consta de varios ingredientes, tuvimos que analizar separadamente cada uno de ellos, y, como resultado de este análisis, llegamos al conocimiento de que dicho bacilo se encontraba con relativa abundancia en el pimentón.

Con el fin de evitar la alteración de las aceitunas decidimos emplear para la confección del aliño pimentón de otra procedencia, pero, al hacer el análisis previo de una nueva muestra, nos encontramos con que llevaba también el mismo bacilo.

Este hecho nos movió al estudio de distintas muestras de pimentón procedentes de varias provincias de España con el propósito de comprobar si se trataba de una bacteria que se encuentra normalmente en este con-

dimento. En efecto, los resultados de las experiencias que a continuación describiremos confirmaron nuestras sospechas, puesto que en todas las muestras analizadas hemos encontrado el mismo bacilo.

MATERIAL

Como es sabido, el pimentón es una sustancia pulverulenta de color rojizo, que es utilizado desde muy antiguo como condimento en las salsas y comidas y como conservador de embutidos.

Se fabrica el pimentón a partir de los pimientos rojos; éstos se secan previamente al sol en lugares bien ventilados, luego se separa el pericarpio de las semillas, cáliz y pedúnculo, y, por último, se reduce a polvo en molinos adecuados.

Para nuestros trabajos hemos elegido siete muestras de pimentón procedentes de las principales provincias productoras.

Las muestras analizadas son las siguientes:

1. Procedente de Murcia (dulce).
2. Procedente de Murcia (picante).
3. Procedente de Albacete (dulce).
4. Procedente de Albacete (picante).
5. Procedente de Cáceres (dulce).
6. Procedente de Cáceres (picante).
7. Procedente de Sevilla (dulce).

MEDIOS

Hemos utilizado los siguientes medios de cultivo:

Czapek-sacarosa al 10 por 100.
Czapek-maltosa al 3 por 100.
Agar común.
Agar-malta.

TECNICAS

Para conseguir el aislamiento hemos hecho una suspensión de pimentón en solución salina estéril y luego hemos sembrado con el asa de platino en placas de Petri de los cuatro medios de cultivo ya indicados.

Incubamos las placas indistintamente a 25° C. o a la temperatura del laboratorio.

RESULTADOS

A las veinticuatro horas de incubación no se observa desarrollo alguno en las placas de Czapek, mientras que en las de agar común y agar-malta ya se pueden observar colonias bacterianas, aunque muy pequeñas todavía.

A las cuarenta y ocho horas se puede apreciar desarrollo microbiano en todas las placas:

En Czapek-sacarosa al 10 por 100 se forman unas colonias pequeñas, muy rugosas, de aspecto de miga de pan, que al principio son incoloras pero con el tiempo se van pigmentando de pardo unas veces; en otros casos producen abundante mucílago incoloro y brillante. En preparación microscópica de estas colonias (fig. 6) podemos observar unos bacilos Gram-positivos, de extremos redondeados, que miden aproximadamente 0,8 micras por 3 micras. Casi todas las células presentan un endosporo elipsoidal que en la mayoría de los casos es central, aunque hay algunos de posición paracentral.

En Czapek-maltosa al 3 por 100 hay un crecimiento análogo al anterior, pero las colonias son mucho más pequeñas. La morfología microscópica es idéntica que en los cultivos en Czapek-sacarosa al 10 por 100.

En agar común se desarrolla el bacilo, dando lugar a dos tipos de colonias: *a)* Una muy brillante y mucosa, hemisférica, que a las setenta y dos horas de incubación alcanza de 8 a 10 mm. de diámetro (fig. 1) y que en preparación microsccópica deja ver unos bacilos Gram-positivos que miden aproximadamente 0,9 micras por 3,5 a 4 micras y que están rodeados por una cápsula mucosa; suelen estas aislados o formando cortas cadenas de 3 a 4 elementos (fig. 8). *b)* El otro tipo de colonia (fig. 1) es algo rugosa e irisada, mucho más plana que la anterior, y a veces forma en su centro una depresión en forma de cráter; el diámetro de estas colonias oscila entre 5 y 6 mm. a las setenta y dos horas de incubación. En preparación microscópica se observan unos bacilos de forma y tamaño igual a los de las colonias mucosas, pero están totalmente desprovistos de cápsulas.

En bastantes casos se pueden observar colonias de tipo intermedio entre los dos anteriores; dichas colonias tienen un centro alto y mucoso, mientras que los bordes son planos, rugosos y con irisaciones (fig. 1).

En las placas de agar-malta crecen unas colonias (fig. 2) blancas, crate-

riformes y muy rugosas, que, observadas con más de diez aumentos, presentan (figs. 3, 4 y 5) una superficie de aspecto azucarado. El olor del cultivo en este medio es peculiar, muy parecido al olor del café con leche. La morfología de los bacilos es algo diferente a la que presentan en agar común: son algo más cortos y más gruesos. Cuando el cultivo es joven, los bacilos presentan una cápsula muy mucosa o filamentos mucoides, como se puede apreciar en las figuras 9 y 10; pero cuando el cultivo tiene ya más de cinco días, se aprecian bacilos esporulados, cuyo aspecto es igual que en la figura 7.

Además de los datos anteriores, nos pareció interesante hacer el recuento de bacilos vivos por gramo de pimentón, para lo cual hemos usado las técnicas corrientemente empleadas en Bacteriología del suelo, basándonos en la analogía existente entre las partículas de pimentón y las de una muestra de tierra seca.

Sembramos en placas de agar común y de agar-malta, incubamos a 25° C. y verificamos el recuento de colonias a las cuarenta y ocho horas. Obtuvimos los resultados que a continuación exponemos:

MUESTRA	BACTERIAS POR GRAMO DE PIMENTÓN
Murcia (dulce)	1.204.000
Murcia (picante)	1.099.000
Albacete (dulce)	840.000
Albacete (picante)	1.355.000
Cáceres (dulce)	630.000
Cáceres (picante)	1.855.000
Sevilla (dulce)	1.694.000

CLASIFICACION

Para la identificación del bacilo hemos seguido las claves de Bergey (2) y las técnicas y claves recomendadas por Smith, Gordon y Clark (10), según las cuales hemos llegado a la conclusión de que se trata del *Bacillus subtilis*.

Las características que nos han servido para la determinación son las siguientes:

Bacilos de 0,8 a 1 micra por 3 a 3,5 micras que se presentan aislados o en cadenas cortas. Extremos redondos. Móvil. Gram-positivo; cuando se tiñe débilmente se pueden distinguir unas pequeñas granulaciones en el citoplasma. Presenta dos variantes: una con cápsula mucosa y otra sin ella.

Cuando se cultiva en agar glucosado, los bacilos alcanzan mayor longitud (de 7 a 10 micras) y las granulaciones citoplasmáticas son mayores que cuando es cultivado en agar común.

Produce rápidamente endosporos elipsoidales de 0,5 a 0,8 micras por 1,5 micras de posición central o paracentral. El diámetro de estos endosporos nunca es mayor que el de la célula vegetativa.

Cultivado en agar común, produce abundante crecimiento, que suele ser mucoso al principio, pero luego las colonias se vuelven rugosas, extendiéndose sus bordes en un crecimiento plano, rugoso y veteado.

En tubos de caldo común se desarrolla en la superficie, permaneciendo el medio casi transparente; en la superficie del medio se forma un ligerísimo velo que, al agitar, se deshace en grumos.

Produce acetil-metil-carbinol. Hemos hecho esta prueba a las cuarenta y ocho, sesenta y dos y noventa y seis horas de incubación a 28° C., añadiendo al cultivo un volumen igual de sosa al 40 por 100 con o sin la adición de creatina; la reacción fué siempre positiva, pero la coloración roja no aparecía inmediatamente, sino después de diez a veinte horas a la temperatura del laboratorio.

Reduce los nitratos a nitritos.

Crece bien en agar común y en caldo común a pH=6.

Hidroliza rápidamente el almidón, la gelatina y la caseína.

Es francamente hemolítico.

Forma ácido sin gas a partir de la arabinosa, xilosa, glucosa, fructosa, mannosa, maltosa, sacarosa, glicerina, manitol, dextrina, inulina, salicina y lactosa. No forma ácido a partir de la galactosa, ramnosa y rafinosa.

DISCUSION

Hemos elegido las muestras de pimentón procurando que fueran procedentes no sólo de las principales provincias productoras, sino también que estas provincias sean distanciadas entre sí con el fin de eludir

el error que pudiera encerrar una generalización; nos falta, sin embargo, estudiar el pimentón de La Rioja, pero, hasta el presente, no nos ha sido posible conseguir muestras de esta región.

Explicamos la presencia del *B. subtilis* en el pimentón según la siguiente hipótesis: Dado que el *B. subtilis* se encuentra en todos los suelos de labor, puede pasar fácilmente a los pimientos, sobre los que se desarrolla activamente durante el tiempo en que el fruto permanece, expuesto al sol, secándose hasta que la pérdida de agua consiguiente impida el desarrollo vegetativo; entonces esporula, quedando los endosporos adheridos a las partículas de pimentón después de la molturación de los pimientos.

Seguramente los números que nosotros hemos obtenido del análisis cuantitativo son inferiores al número real de bacterias vivas por gramo de pimentón, puesto que, como ocurre en el recuento de bacterias del suelo, una colonia puede corresponder a varios endosporos que se encuentren adheridos a la misma partícula de pimentón. Además, estas cifras, por ahora, tienen relativa importancia porque, según nuestra hipótesis, dependen del período de tiempo que permanezcan húmedos los pimientos; este tiempo dependerá, a su vez, de varios factores, como son la humedad atmosférica, la nubosidad, la temperatura, etc.

Si compaginamos los conocimientos que hemos adquirido a lo largo de este trabajo con los hechos que encontramos descritos en la literatura concerniente al caso, surgen inmediatamente dos cuestiones: 1.ª ¿Es el *B. subtilis* el que determina ciertas propiedades del pimentón como condimento y como conservador? 2.ª La adición de pimentón ¿es eficaz en todos los casos?

La primera cuestión surge de los trabajos de Jordanoff (7) y Dold y Knapp (4), en los que se le atribuye al pimentón un marcado efecto antibacteriano, al relacionarlos con una serie de recientes trabajos, como son los de Cercos (3), Gupta (5), Hassall (6), Landy (8), Tsukamura y Yasutami (11) y Alexopoulos, Arnet e Intosh (1), en los que se demuestra que el *B. subtilis* produce una serie de sustancias inhibidoras del crecimiento no sólo de bacterias, sino también de ciertos hongos. Actualmente nos encontramos verificando trabajos encaminados a la resolución de esta cuestión, cuyo resultado comunicaremos en una nueva publicación.

También creemos lógico suponer que el *B. subtilis* desempeña algún papel en la serie de transformaciones químicas que Martínez García (9)

ha demostrado que tienen lugar durante el período de desecación de los pimientos.

La segunda cuestión se deriva del hecho cierto de que el pimentón se viene usando como conservador eficaz de numerosos alimentos, pero en algunos casos es contraproducente, como ocurre en las aceitunas aliñadas que nosotros hemos analizado, en las que encontramos al *B. subtilis*, introducido con el pimentón, como el causante del reblandecimiento que se opera en las aceitunas.

Además del *B. subtilis* hemos aislado del pimentón otros dos microorganismos: un coco Gram-positivo y un moho del género *Mucor*. El primero surgió sólo en alguna de las placas con pimentón dulce de Albacete en una proporción unas cien veces menor que el *B. subtilis*. El *Mucor* apareció solamente en la muestra de pimentón sevillano, también en muy baja proporción. Por su poca abundancia y, sobre todo, porque no se encuentran en todas las muestras de pimentón, consideramos accidental la presencia de estos dos microorganismos.

CONSECUENCIAS

1.—El *Bacillus subtilis* se encuentra con relativa abundancia en las siete muestras de pimentón que hemos analizado.

2.—Es posible que el pimentón deba ciertas propiedades antifermentativas a productos metabólicos del *B. subtilis*.

3.—Es extraño que un producto que contiene abundantes microorganismos vivos activamente hidrolíticos, se emplee como conservador de alimentos.

RESUMEN

Hemos estudiado siete muestras de pimentón y en todas ellas hemos encontrado con relativa abundancia una bacteria que identificamos como *Bacillus subtilis*.

SUMMARY

Seven samples of paprika have been studied and in all of them a relatively abundant bacterium have been found. This bacterium has been studied and identified as being *Bacillus subtilis*.

BIBLIOGRAFIA

(1) Alexopoulos, C. J.; Arnet, R., and Mc Intosh, A. V.; 1938. Studies on antibiosis between bacteria and fungi. Ohio Jour. Sci. 38: 221-232.

(2) Bergey, D. H.; Breed, R. S.; Murray, E. G. D., and Hitchens, A. P.; 1948. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. 6. Baltimore.

(3) Cercos, A. P.; 1954. Fungocina, antibiótico sintetizado por el *Bacillus subtilis*. An. Soc. Cient. Argentina, 157: 38-46.

(4) Dold, H., and Knapp, A.; 1948. Ueber die antibakterielle Wirkung von Gewerzen. Zeitschr. Hyg. u. Infektionskranz, 128: 696-706.

(5) Gupta, B. M.; Dudani, A. T., and Shrivastava, D. L.; 1953. An antibiotic from a soil bacillus. Jour. Sci. and Indust. Res., 12B; 333-334.

(6) Hassall, C. H.; 1948. Subtilin C: ar antibiotic concentrate from *Bacillus subtilis*. Nature (London): 317-318.

(7) Jordanoff, M.; 1927. Untersuchungen über die baktericide Wirkung des scharfen Paprika. Jahresber. Univ. Sofia, Vet. Med. Fakultät, 3: 55-74.

(8) Landy, M.; Roseman, S. B., and Warren, G. H.; 1947. An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against patogenic fungi. Jour. Bact. 54: 24.

(9) Martínez García, F.; 1952. Sobre la presencia de estereoisomeros de capsorrubina en el pimentón. Farmacognosia, 12: 169-182.

(10) Smith, N. R.; Gordon, R. E., and Clark, F. E.; 1946. Aerobic mesophilic sporeforming bacteria. Miscellaneous Publication. N.º 559. U. S. Department of Agriculture.

(11) Tsukamura, M., and Yasutami, T.; 1951. Studies on the antibiotic substances produced by sporeforming bacteria. V. Two antibiotics produced by a strain of *Bacillus subtilis* group. Jour. Antibiotics (Tokyo) 4; 307-310.

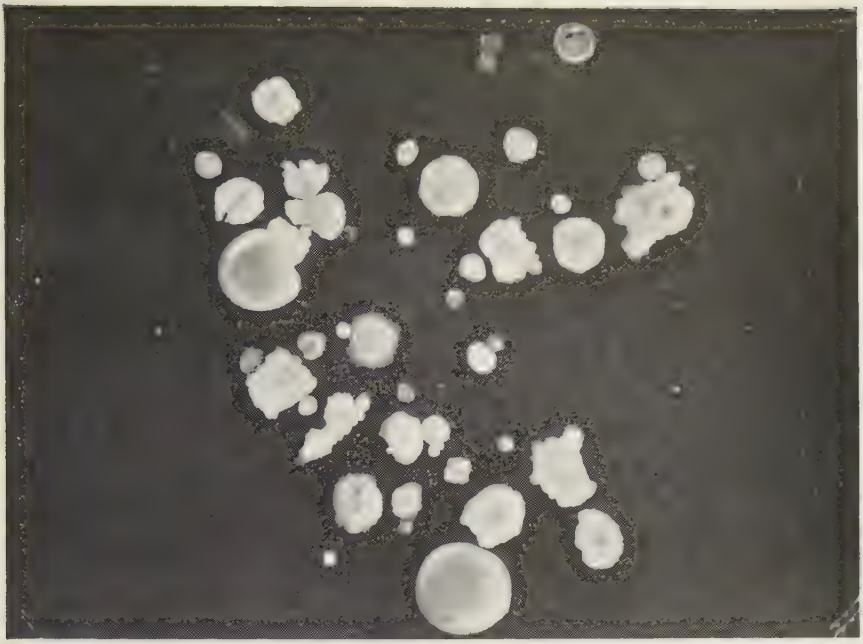


FIG. 1.

Siembra de pimentón en placa de agar común. Cultivo de cuatro días. Se pueden apreciar las colonias de tipo mucoso, tipo rugoso y colonias intermedias.

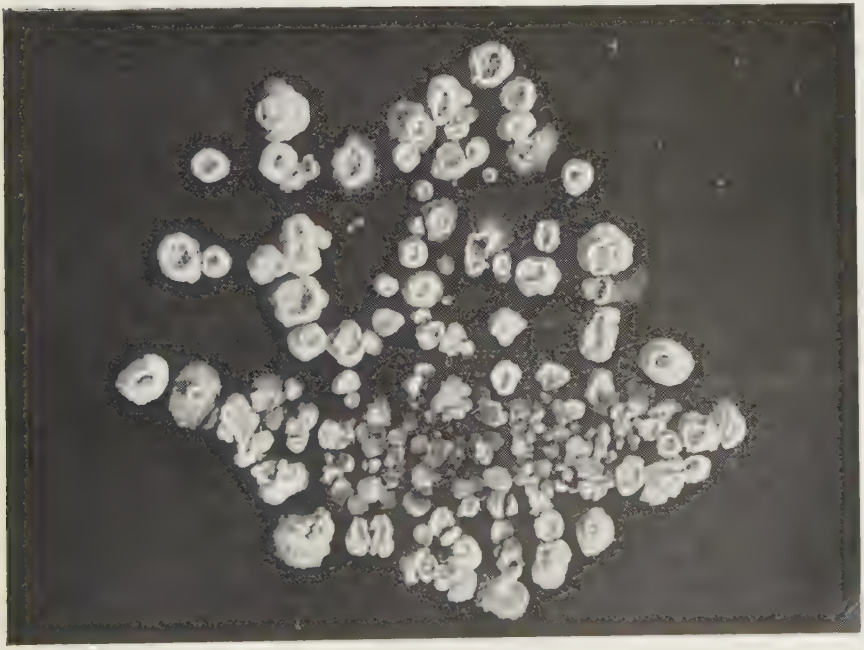


FIG. 2.

Siembra de pimentón en placa de agar-malta. Cultivo de cuatro días, donde se pueden ver las colonias crateriformes.

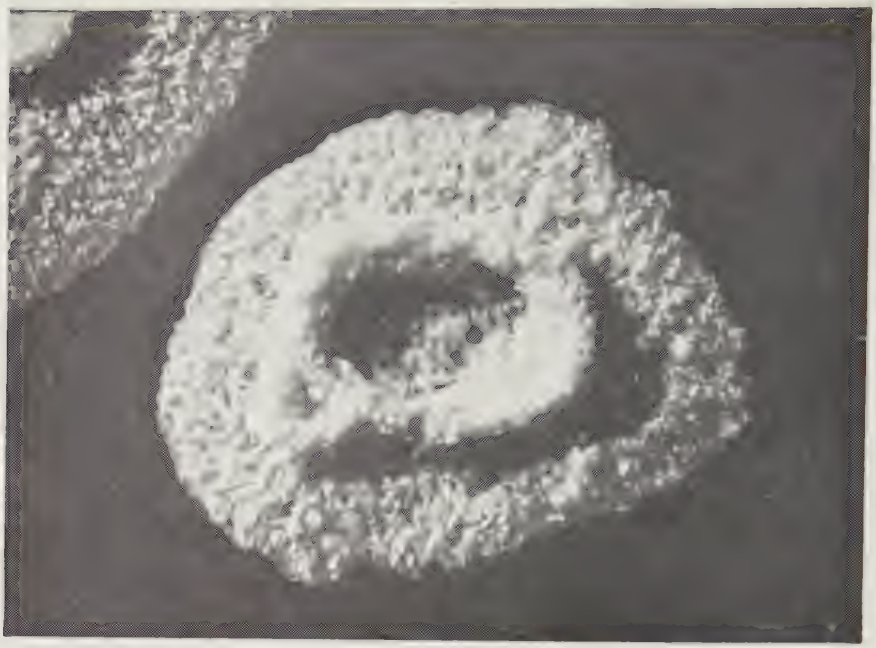


FIG. 1.

FIG. 2.

FIGS. 3, 4 Y 5.
Colonias crateriformes vistas con mayor aumento.

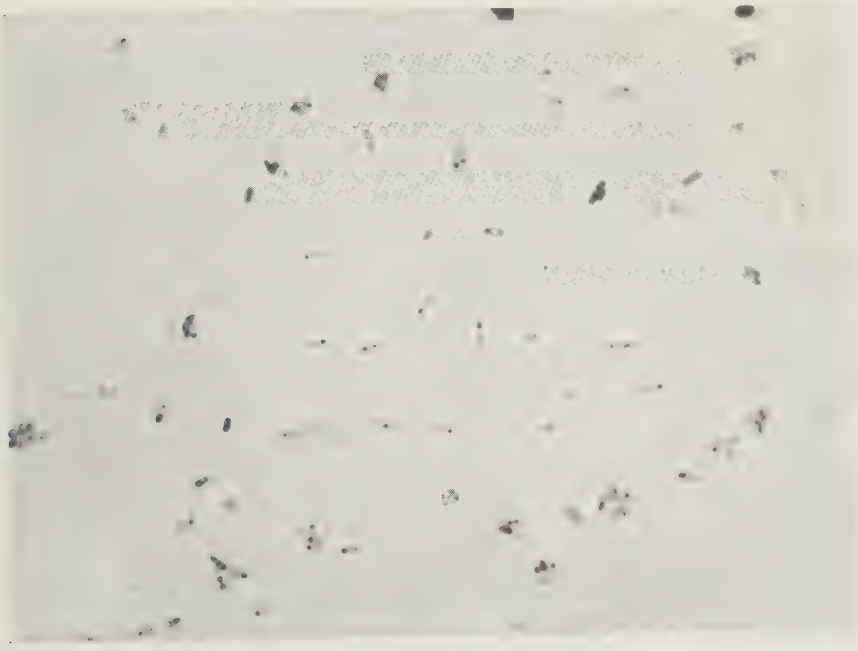


FIG. 6.
B. subtilis. Cultivo de seis días en Czapek-sacarosa al 10 por 100.

FIG. 7.
B. subtilis. Extensión de colonia rugosa irisada, a los tres días de incubación en agar común.

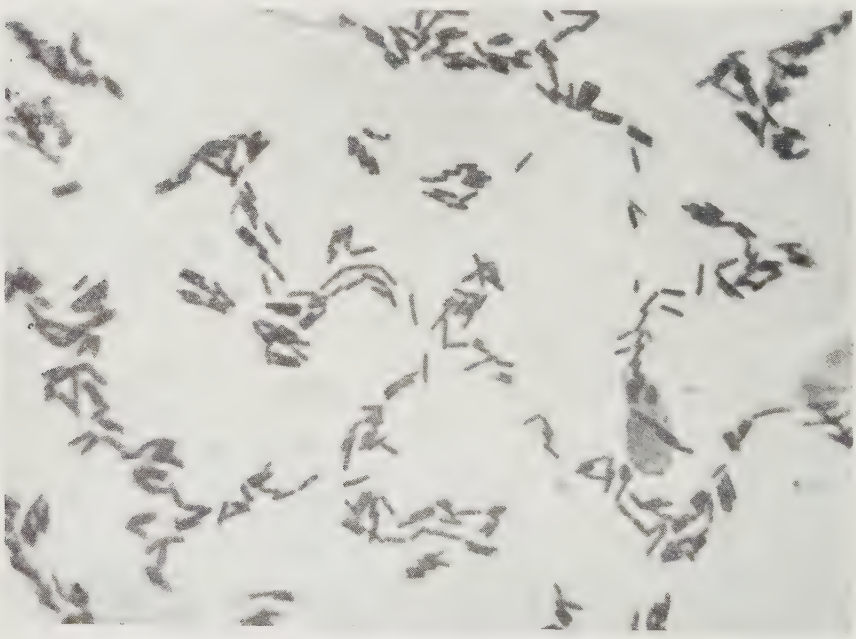


FIG. 8.
B. subtilis. Extensión de colonia mucosa a los tres días de incubación en agar común.

FIGS. 9 y 10.

B. subtilis. Extensión de colonia mucosa a los tres días de incubación en agar-malta.

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA DE MADRID

ACCION DE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LOS *RHIZOBIUM*

POR

EULALIA CABEZAS DE HERRERA

INTRODUCCION

En nuestros trabajos con el género *Rhizobium*, nos encontramos con un bacilo dos o tres veces mayor que éste, capaz de infectar las leguminosas, de cuyos nódulos fué aislado junto con la forma normal.

Revisando la bibliografía, vimos que Bisset y Hale (1951) y Bisset (1952) lo citan como *Rhizobium*, aunque tiene características totalmente diferentes; entre otras, el qu posee endosporas resistentes a la ebullición; Kleczkowska (1950) también lo cita como Gram positivo.

Viendo estas grandes diferencias, se pensó hacer el estudio de la acción de la luz U. V. sobre ambas formas.

PARTE EXPERIMENTAL

Disponemos de una estufa de luz ultravioleta que nos ha sido cedida por la casa Siemens, a la que sinceramente agradecemos su colaboración.

La estufa posee las siguientes características, según informe del Instituto «Daza de Valdés» de Optica (Sección de Fotometría y Colorimetría), del C. S. I. C.:

Estufa con dos lámparas de mercurio de Sylvania, de tipo germicida de 15W. Las paredes de la estufa están recubiertas por planchas de aluminio.

Método y medidas realizadas.

Se ha medido la irradiación que recibe un punto en el centro de la estufa, con los dos estantes de plexiglás puestos. Para ello, se ha empleado una termopila, que se ha dirigido en varias direcciones, una vez situa-

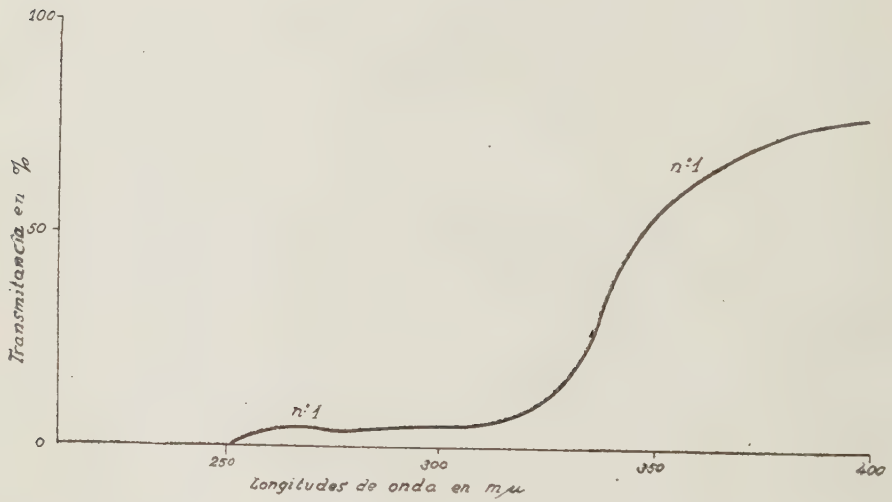
da en el centro de la estufa. Como se obtenían valores de irradiancia muy aproximados, hemos supuesto que la irradiancia sobre un punto en el centro de la estufa está compuesta por dos sumandos:

Uno constante, y que es igual para cualquier punto interior de la estufa, y es debido a la energía procedente de todas las paredes, debida a las interreflexiones. Como para un ángulo sólido de 20 × 45° (que es el de recepción de la termopila), resultaron 1,45 W. × m^2, integrando en todo el espacio, resultó que esta irradiancia es igual a 68,7 W. por m^2.

El otro es la energía recibida por el punto directamente de las lámparas, que medida resultó ser de 5,23 W. por m^2 para cada lámpara, es decir, de 10,5 W. por m^2 entre las dos.

Resultados obtenidos.

De las medidas descritas en el párrafo anterior se deduce que la energía recibida por un punto situado en el centro de la estufa es un total de 79,1 W. por m^2.

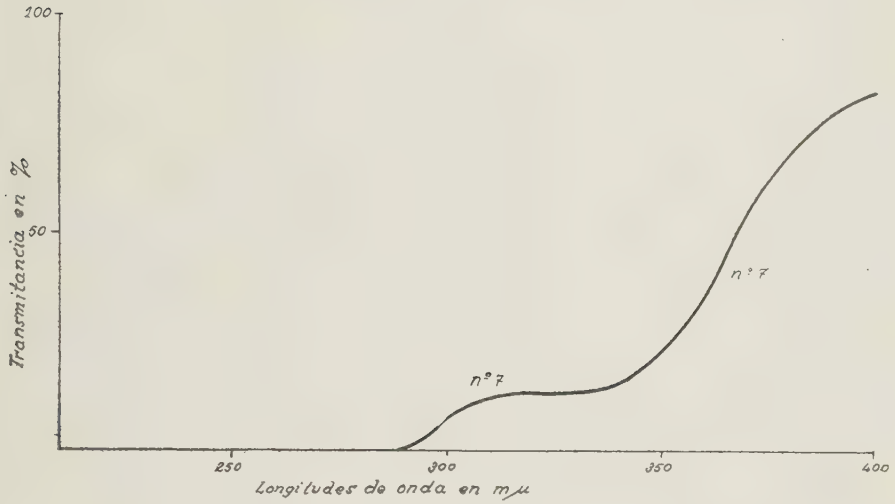


GRÁFICA 1.

Según se ha encontrado en los catálogos, las lámparas del tipo de las que se usan en esta estufa emiten el 90,4 por 100 de su energía total en la

raya de mercurio de longitud de onda 2537 Å y, por tanto, de la energía interior solamente es energía en el ultravioleta y con poder germicida de 71,5 W. por m^2.

Como se sabe, el máximo del poder germicida de la radiación está hacia los 2600 Å, y en raya de mercurio antes citada la eficiencia germicida es de 0,96.



GRÁFICA 2.

Por tanto, la efectividad germicida de la estufa será 68,6 W. equivalentes por m^2, o bien expresado en mlw, como a veces se hace, 68.600mlw equivalentes por m^2.

Disponemos también de una colección de filtros Necron, que dejan pasar cada uno una determinada longitud de onda. Las gráficas 1 y 2 indican las características de los filtros primero y último de la colección.

Estirpes de Rhizobium *y procedencia.*

De las estirpes de Rhizobium de nuestra colección, elegimos aquellas que mostraban características menos afines entre ellas, para comprobar

si estas mismas diferencias se reflejan al actuar sobre ellas la luz ultravioleta.

Estirpes	Procedencia	Carta
N.° 1	*Trifolium incarnatum*	N.° 1
» 3	*Vicia sativa*	» 2
» 4	*Medicago sativa*	» 3
» 5	*Lupinus angustifolius*	» 4
» 10	*Lens sculenta*	» 5

Experiencias de tanteo.

Como la estufa de que disponemos, anteriormente descrita, emite una longitud de onda de poder bactericida y sólo queremos provocar mutaciones en los *Rhizobium,* hacemos uso de los filtros 1 y 7 (gráficas 1 y 2), que sólo dejan pasar una longitud de onda de 340 mm. en adelante.

Hicimos ensayos para encontrar el momento en que se produjera alguna alteración en las bacterias, para lo cual hicimos una suspensión en agua destilada estéril de cada una de las estirpes, sembramos en placas Petri que contenían medio 79' agar, e inmediatamente las sometimos a la acción de la luz ultravioleta.

Empezamos por un tiempo de irradiación de cinco minutos, aumentando de 5' en 5' hasta llegar a 100'.

Pusimos las placas a cultivar en estufa de 25°; a los cinco días tanto las placas irradiadas bajo la protección del filtro núm. 1, como las irradiadas bajo la protección del filtro núm. 7, tenían crecimiento normal, y al observar al microscopio comprobamos que no habían sufrido ninguna modificación en su morfología.

Entonces las sometimos directamente a la acción de la lámpara, empezando por 5' y aumentando de 5' en 5' hasta 110'.

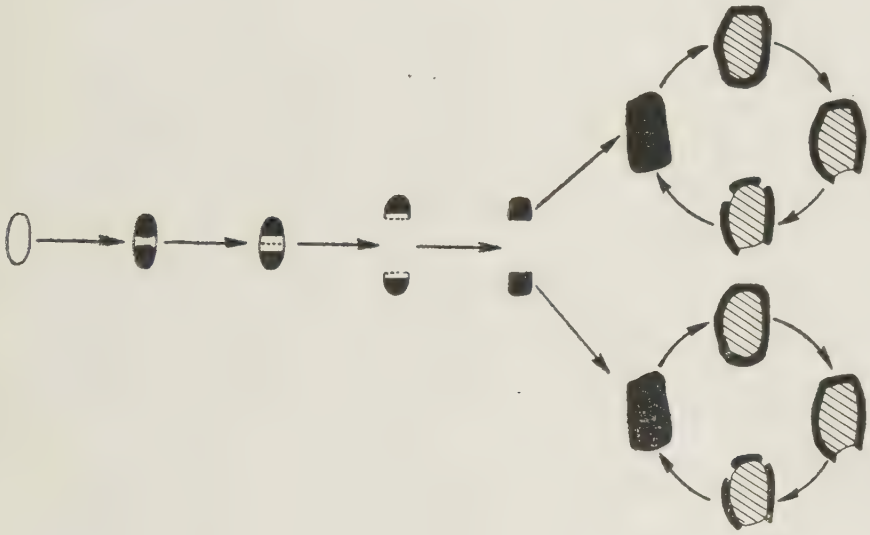
A los cinco días de cultivo en estufa de 25° aparecieron colonias típicas de estas estirpes, que disminuían de tamaño y en número según iba aumentando el tiempo de irradiación, llegando a ser prácticamente nulo su crecimiento a los 105'.

Al observar al microscopio vemos que hasta los 35' no se producía ninguna modiacación en su forma. De los 40' a los 100' se mostraban muy polimorfos. Unas estirpes disminuyen de tamaño tomando un as-

pecto cocoide, siendo tanto más pequeño cuanto mayor es el tiempo de irradiación. Otras aumentan de tamaño, tomando una forma cuadrangular.

Proceso evolutivo.

Estudiamos el proceso evolutivo de estas formas sembrando e irradiando en las mismas condiciones que dijimos anteriormente, y haciendo preparaciones de los cultivos periódicamente, hasta sorprender el momento en que se produjeran estos cambios. Comprobamos que en los *Rhizobium* normales la disminución de tamaño se produce durante el tiempo de irradiación.



GRÁFICA 3.

En las formas que nosotros llamamos gigantes se producen el siguiente ciclo, que detallamos en el gráfico núm. 3, reconstituyendo los distintos estadios que hemos visto en las preparaciones al microscopio corriente, microscopio de fases y microscopio electrónico, y que recogemos en las fotografías del 1 al 15.

De una forma bacilar, de bordes redondeados, con un protoplasma

homogéneo y a veces con masas internas más opacas (se tiñen más fuerte con los colorantes básicos, y al microscopio electrónico son más opacas a los electrones), que probablemente corresponden a gránulos nucleares, se pasa a una forma más alargada, en la que las partes más densas unas veces se polarizan en los extremos, dejando una zona clara en el centro, que parece está constituída sólo por la membrana; otras cruzan transversalmente el cuerpo bacilar.

Tanto en un caso como en otro la membrana de la bacteria acaba por romperse por el claro del centro, y se pueden ver separados los extremos que han tomado una forma redondeada por un lado y cuadrangular por otro, en el cual se pueden apreciar restos de la membrana.

Estas formas, conservando su tamaño y su aspecto cuadrangular, pasan a una nueva fase, en la cual se puede observar cómo la parte más densa del protoplasma se condensa en los bordes, dando un aspecto de mucha mayor refrigencia a la bacteria y dejando en el centro una zona clara con el aspecto de una gran vacuola cuadrangular, probablemente formada por la membrana y un líquido interno.

En la fase posterior hemos podido observar cómo estos bordes compactos y bien delimitados con el aspecto de un cordón que rodea la célula se rompe por uno, dos o más sitios, liberando formas bacilares.

Estas nuevas formas son algo mayores que la forma bacilar normal del *Rhizobium*, más compactas y algo más refringentes.

Comportamiento biológico.

1.° Sembramos cada una de las estirpes irradiadas durante 40′, 60′, 80′ y 90′, en los distintos azúcares y medios de cultivo en que lo habíamos hecho con las mismas estirpes, antes de someterles a la acción de la luz ultravioleta.

Los resultados los expresamos en las tablas núms. 6, 7, 8, 9 y 10.

2.° Sembramos cada una de las estirpes irradiadas durante 40′, 60′, 80′ y 90′ a distintos pH, cuyos resultados expresamos en las tablas números 11, 12, 13 y 14.

3.° Sobre un soporte de vermiculita, y en condiciones de esterilidad (ver E. Cabezas de Herrera, 1956), sembramos alfalfa inoculada con estirpe núm. 4, irradiado durante 40′, 60′, 80′ y 90′. Llevamos las macetas al invernadero y regamos con solución nutritiva de Bond, modificada por Crone, alternando con agua, según las necesidades de la planta.

A los dos meses de cultivo en invernadero obtuvimos los siguientes resultados:

Nº de macetas sembradas	Tiempo de irradiación	N.º de macetas que nodularon
4	40′	3
4	60′	2
4	80′	—
4	90′	—

Al hacer el aislamiento de los *Rhizobium*, de los nódulos de estas plantas observamos que tenían las mismas características que las de la estirpe con que infectamos.

4.° En las mismas condiciones que explicamos anteriormente (3.°) sembramos alfalfa inoculada con estirpe núm. 4, sometida a irradiación durante 40′, 60′, 80′ y 90′, y cultivada posteriormente en un medio de cultivo a pH 3,5 (E. Cabezas de Herrera, 1956).

Sembramos 8 macetas para cada tiempo de irradiación; de ellas hacemos tres lotes, uno lo regamos con solución nutritiva de Bond a pH 6,5, otro con esta misma solución nutritiva a pH 4,5 y otro con solución nutritiva a pH 3,5. Los riegos con estas soluciones los alternamos con agua, según las necesidades de las plantas.

A los dos meses de cultivo en el invernadero obtuvimos los resultados que expresamos en la tabla núm. 15, y en las fotos núms. 16, 17, 18 y 19.

TABLA NUM. 1

«RIZOBIUM» AISLADO DE «TRIFOLIUM INCARNATUM». ESTIRPE NÚM. 1

Procedencia ... ... Tapias de Casariego.
Morfología... ... ... Bacilos cortos y bacteroides.
Colonias... ... ... Blancas traslúcidas.
Gram ... ... Negativo.

MEDIO	5 DÍAS
Fructosa.	Acidifica.
Glucosa.	»
Sacarosa.	»
Maltosa.	»
Galactosa	—
Manosa.	Acidifica.
Lactosa.	—
Xilosa.	—
Arabinosa.	—
Ramnosa.	—
Rafinosa.	Acidifica.
Almidón.	»
Salicina.	— y gas.
Leche.	Acidifica, gas.
Clark y L.	—
Nitratos.	—
Indol.	—

— = reacción negativa.

TABLA NUM. 2

«RHIZOBIUM» AISLADO DE «VICIA SATIVA», ESTIRPE NÚM. 3

Procedencia ... ... Archidona.
Morfología ... ... Bacilos cortos y bacteroides.
Colonias... ... ... Blancas traslúcidas.
Gram ... ... Negativo.

MEDIO	5 DÍAS
Glucosa.	—
Fructosa.	—
Sacarosa.	—
Maltosa.	—
Galactosa.	—
Manosa	—
Lactosa.	—
Xilosa.	—
Arabinosa.	—
Ramnosa.	—
Rafinosa.	—
Almidón.	—
Salicina.	—
Leche.	Acidifica.
Clark y L.	—
Nitratos.	—
Indol.	—

— = reacción negativa.

TABLA NUM. 3

«RHIZOBIUM» AISLADO DE «MEDICAGO SATIVA». ESTIRPE NÚM. 4

Procedencia ... ... Toledo.
Morfología ... ... Bacilos cortos y bacteroides.
Colonias... ... ... Blancas traslúcidas.
Gram ... ... Negativo.

MEDIO	5 DÍAS
Glucosa.	—
Fructosa.	Acidifica.
Sacarosa.	—
Maltosa.	—
Galactosa.	—
Manosa.	—
Lactosa.	—
Xilosa.	Acidifica.
Arabinosa.	—
Ramnosa.	—
Rafinosa.	—
Almidón.	Acidifica.
Salicina.	—
Leche.	Acidifica.
Clark y L.	—
Nitratos.	—
Indol.	—

— = reacción negativa.

TABLA NUM. 4

«RHIZOBIUM» AISLADO DE «LUPINUS ANGUSTIFOLIUS». ESTIRPE NÚM. 5

Morfología ... ... Bacilos cortos y bacteroides.
Procedencia ... ... Felanitx.
Colonias... ... ... Blancas traslúcidas.
Gram ... ... Negativo.

MEDIO	5 DÍAS
Glucosa.	—
Fructosa.	—
Sacarosa.	—
Maltosa.	—
Galactosa.	—
Manosa.	—
Lactosa.	—
Xilosa.	—
Arabinosa.	—
Ramnosa.	—
Rafinosa.	—
Almidón.	—
Salicina.	—
Leche.	Acidifica.
Clark y L.	—
Nitratos.	—
Indol.	—

— = reacción negativa.

TABLA NUM. 5

«RHIZOBIUM» AISLADO DE «LENS SCULENTA». ESTIRPE NÚM. 10

Procedencia ... ... Toledo.
Morfología ... ... Bacilos cortos y bacteroides.
Colonias... ... ... Blancas mucilaginosas.
Gram ... ... Negativo.

MEDIO	5 DÍAS
Glucosa.	Acidifica.
Fructosa.	»
Sacarosa.	»
Maltosa.	—
Galactosa.	Acidifica.
Manosa.	—
Lactosa.	Acidifica.
Xilosa.	—
Arabinosa.	—
Ramnosa.	—
Rafinosa.	Acidifica.
Almidón.	—
Salicina.	—
Leche.	Acidifica.
Clark y L.	—
Nitratos.	—
Indol.	—

— = reacción negativa.

TABLA NUM. 6

ESTIRPE NÚM. 1 DE «RHIZOBIUM» PROCEDENTE DE «TRIFOLIUM INCARNATUM»

MEDIOS	TIEMPO DE IRRADIACIÓN			
	40′	60′	80′	90′
Glucosa	—	—	—	—
Fructosa	—	—	—	—
Ramnosa	—	—	—	—
Salicina	—	—	—	—
Sacarosa	—	—	—	—
Galactosa	—	—	—	—
Lactosa	—	—	—	—
Maltosa	—	—	—	—
Rafinosa	—	—	—	—
Almidón	—	—	—	—
Xilosa	—	—	—	—
Manosa	—	—	—	—
Leche	+	+	+	+
Clack y L.	—	—	—	—
Nitratos	—	—	—	—
Indol	—	—	—	—

— = reacción negativa. + = acidifica.

TABLA NUM. 7

ESTIRPE NÚM. 3 DE «RHIZOBIUM» PROCEDENTE DE «VICIA SATIVA»

MEDIOS	TIEMPO DE IRRADIACIÓN			
	40′	60′	80′	90′
Glucosa	—	—	—	—
Fructosa	—	—	—	—
Ramnosa	—	—	—	—
Salicina	—	—	—	—
Sacarosa	—	—	—	—
Galactosa	—	—	—	—
Lactosa	—	—	—	—
Maltosa	—	—	—	—
Rafinosa	—	—	—	—
Almidón	—	—	—	—
Xilosa	—	—	—	—
Manosa	—	—	—	—
Leche	+	+	+	+
Clack y L.	—	—	—	—
Nitratos	—	—	—	—
Indol	—	—	—	—

— = reacción negativa. + = acidifica.

TABLA NUM. 8

ESTIRPE NÚM. 4 DE «RHIZOBIUM» PROCEDENTE DE «MEDICAGO SATIVA»

MEDIOS	TIEMPO DE IRRADIACIÓN			
	40′	60′	80′	90′
Glucosa	—	—	—	—
Fructosa	—	—	—	—
Ramnosa	—	—	—	—
Salicina	—	—	—	—
Sacarosa	—	—	—	—
Galactosa	—	—	—	—
Lactosa	—	—	—	—
Maltosa	—	—	—	—
Rafinosa	—	—	—	—
Almidón	—	—	—	—
Manosa	—	—	—	—
Leche	+	+	+	+
Clack y L.	—	—	—	—
Nitratos	—	—	—	—
Indol	—	—	—	—

— = reacción negativa. + = acidifica.

TABLA NUM. 9

ESTIRPE NÚM. 5 DE «RHIZOBIUM» PROCEDENTE DE «LUPINUS ANGUSTIFOLIUS»

MEDIOS	TIEMPO DE IRRADIACIÓN			
	40′	60′	80′	90′
Glucosa	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+
Ramnosa	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+
Sacarosa	—	—	—	—
Galactosa	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+
Maltosa	±	±	±	—
Rafinosa	+	+	+	+
Almidón	+	+	±	+
Manosa	+	+	+	+
Leche	+	+	+	+
Clack y L.	—	—	—	—
Nitratos	—	—	—	—
Indol	—	—	—	—

— = reacción negativa. + = acidifica.

TABLA NUM. 10

ESTIRPE NÚM. 10 DE «RHIZOBIUM» PROCEDENTE DE «LENS SCULENTA»

MEDIOS	TIEMPO DE IRRADIACIÓN			
	40′	60′	80′	90′
Glucosa	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+
Ramnosa	—	—	—	—
Salicina	—	+	—	—
Sacarosa	—	—	—	—
Galactosa	+	+	+	+
Lactosa	—	—	—	—
Maltosa...	—	+	—	—
Rafinosa	+	+	+	—
Almidón	—	—	—	—
Manosa...	—	—	—	—
Leche	+	+	+	+
Clack y L.	—	—	—	—
Nitratos	—	—	—	—
Indol	—	—	—	—

— = reacción negativa. + = acidifica.

TABLA NUM. 11

TABLA DE pH DESPUÉS DE IRRADIAR LAS ESTIRPES DURANTE 40′

ESTIRPES	pH DEL MEDIO DE CULTIVO						
	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
N.º 1	—	±	+	+	+	+	+
N.º 3	—	—	+	+	+	+	+
N.º 4	—	—	±	+	+	+	+
N.º 5	—	±	+	+	+	+	+
N.º 10	—	—	+	+	+	+	+

— = crecimiento nulo. + = crecimiento normal.

TABLA NUM. 12

TABLA DE pH DESPUÉS DE IRRADIAR LAS ESTIRPES DURANTE 60'

ESTIRPES	pH DEL MEDIO DE CULTIVO						
	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
N.º 1	—	±	+	+	+	+	+
N.º 3	—	—	+	+	+	+	+
N.º 4	—	—	±	+	+	+	+
N.º 5	—	±	+	+	+	+	+
N.º 10	—	—	+	+	+	+	+

— = crecimiento nulo. + = crecimiento normal.

TABLA NUM. 13

TABLA DE pH DESPUÉS DE IRRADIAR LAS ESTIRPES DURANTE 80'

ESTIRPES	pH DEL MEDIO DE CULTIVO						
	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
N.º 1	—	—	±	+	+	+	+
N.º 3	—	—	±	+	+	+	+
N.º 4	—	—	—	±	+	+	+
N.º 5	—	±	±	+	+	+	+
N.º 10	—	—	±	+	+	+	+

— = crecimiento nulo. + = crecimiento normal.

TABLA NUM. 14

TABLA DE pH DESPUÉS DE IRRADIAR LAS ESTIRPES DURANTE 90'

ESTIRPES	pH DEL MEDIO DE CULTIVO						
	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
N.º 1	—	—	±	+	+	+	+
N.º 3	—	—	±	+	+	+	+
N.º 4	—	—	—	±	+	+	+
N.º 5	—	±	±	+	+	+	+
N.º 10	—	—	±	+	+	+	+

— = crecimiento nulo. + = crecimiento normal.

TABLA NUM. 15

N.º macetas sembradas	Tiempo de irradiación	pH del medio	pH solución riego	Macetas q. nodul.
4	40′	3,5	6,5	3
4	40′	3,5	4,5	2
4	40′	3,5	3,5	—
4	60′	3,5	6,5	2
4	60′	3,5	4,5	2
4	60′	3,5	3,5	—
4	80′	3,5	6,5	—
4	80′	3,5	4,5	—
4	80′	3,5	3,5	—
4	90′	3,5	6,5	—
4	90′	3,5	4,5	—
4	90′	3,5	3,5	—

DISCUSION

Durante muchos años se ha pensado que la radiación con luz U. V. efectuaba un cambio químico directamente en moléculas biológicamente importantes, capaces de absorber esta radiación.

Por otra parte, se ha comprobado (Zelland y Hollaendor) que la mayor acción mutagénica es producida por la longitud de onda de 2600 Å, longitud que coincide con la absorción del ácido desoxiribonucleico. Kelner lo interpreta diciendo que el efecto básico de la luz U. V. sobre una célula bacteriana es la inmediata y específica inhibición de la síntesis del ácido desoxiribonucleico, y que muchos de los efectos de la luz U. V., tales como la letalidad, mutación, etc., pueden ser consecuencias secundarias de este efecto fundamental.

Por nuestra parte, hemos podido observar que toda longitud de onda inferior a 2537 Å no produce ninguna alteración en el cultivo y morfología de los *Rhizobium*, aunque el tiempo de exposición se prolongue hasta cien minutos.

Con longitud de onda 2537 Å, y después de una irradiación de cuarenta-noventa minutos, comienza a disminuir el crecimiento de los cultivos, llegando a inhibirse totalmente a los ciento cinco minutos de exposición.

Durante el período de irradiación se produce una disminución de tamaño en los *Rhizobium*, siendo éste tanto más pequeño cuanto mayor es el tiempo de exposición, hasta que desaparecen.

Esta disminución de tamaño también se produce cuando crecen estas bacterias en un medio de cultivo de pH inferior al de su crecimiento normal; pero en este caso vuelven a su estado normal al cesar condiciones que lo provocan (E. Cabezas de Herrera, 1956).

Al poner a cultivar las extensiones de *Rhizobium* después de irradiadas, la estirpe normal crece, conservando la forma coco bacilar producida por la acción de la luz U. V.; la forma gigante sufre una serie de cambios según el ciclo antes descrito, y da una forma más resistente a la acción de los pH bajos, llegando a vivir en medios de cultivo de pH 3,5.

Esta gran resistencia puede explicarse, ya que, según observaciones de Bisset que hemos podido comprobar en nuestro trabajo, esta estirpe posee endosporas resistentes (fotos 7 y 11), lo que les permite poder permanecer en estado latente hasta que de nuevo se produzcan condiciones favorables para su desarrollo, conservando su poder de nodulación. Al comprobar éste, inoculando la leguminosa respectiva con la nueva estirpe, observamos que la estirpe aislada de los nódulos de esta planta tenía las mismas características que las de la estirpe con la que infectamos.

Las fotografías del microscopio electrónico han sido hechas en el Instituto «Daza Valdés» de Optica, con un modelo R. C. A.-M. V. 2.

Agradecemos a la doctora González Peña su valiosa ayuda en el manejo del mismo.

RESUMEN

Estudiamos las modificaciones que sufren los *Rhizobium* por la acción de la luz ultravioleta y la repercusión que estas modificaciones tienen en su comportamiento biológico, especialmente en su resistencia a los pH bajos.

SUMMARY

Modifications on *Rhizobium* sp. produced by U. V. L, are studied. Change in its biological behaviuor, especially in resistence to low after this modifications, was obtained.

BIBLIOGRAFIA

Bisset, K. A., and Hale, C. M. F. 1951. The production of swarmers in *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 5, 592.

Bisset, K. A. 1952. Complete and reduced life cycles in *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 7, 233-242.

Cabezas de Herrera, E. 1956. Infección de la alfalfa con distintas estirpes de *Rhizobium*. Anal. Edaf., XV-I, 85-110.

Cabezas de Herrera, E. 1956. Acción del pH sobre los *Rhizobium*. Anal. Adaf., XV, 2, 167-184.

Hollaender, A., and Stapleton, G. E. 1953. New aspectes of the oxygen concentration effect in X-ray inactivation of bacterial suspensions. Federation Proc., 12, 70.

Hollaender, A., and Stapleton, G. E. 1953. Fundamental aspects of radiation protection from a microbiological point of view. Physiol. Rev., 33, 77-84.

Kelner, A. 1949. Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* with special reference to the dose—reduction principle and to ultraviolet—induced mutation. J. Bacteriol. 58, 511-522.

Kelner, A. 1953. Growth, respiration and nucleic acid syntesis in ultraviolet-irradiated and in photoreactivated *Escherichia coli*. J. Bacteriol, 65, 252-262.

Kelner, A. 1955. Radiation effects on cells and bacteria. Bact. Rew., 19, 1-22.

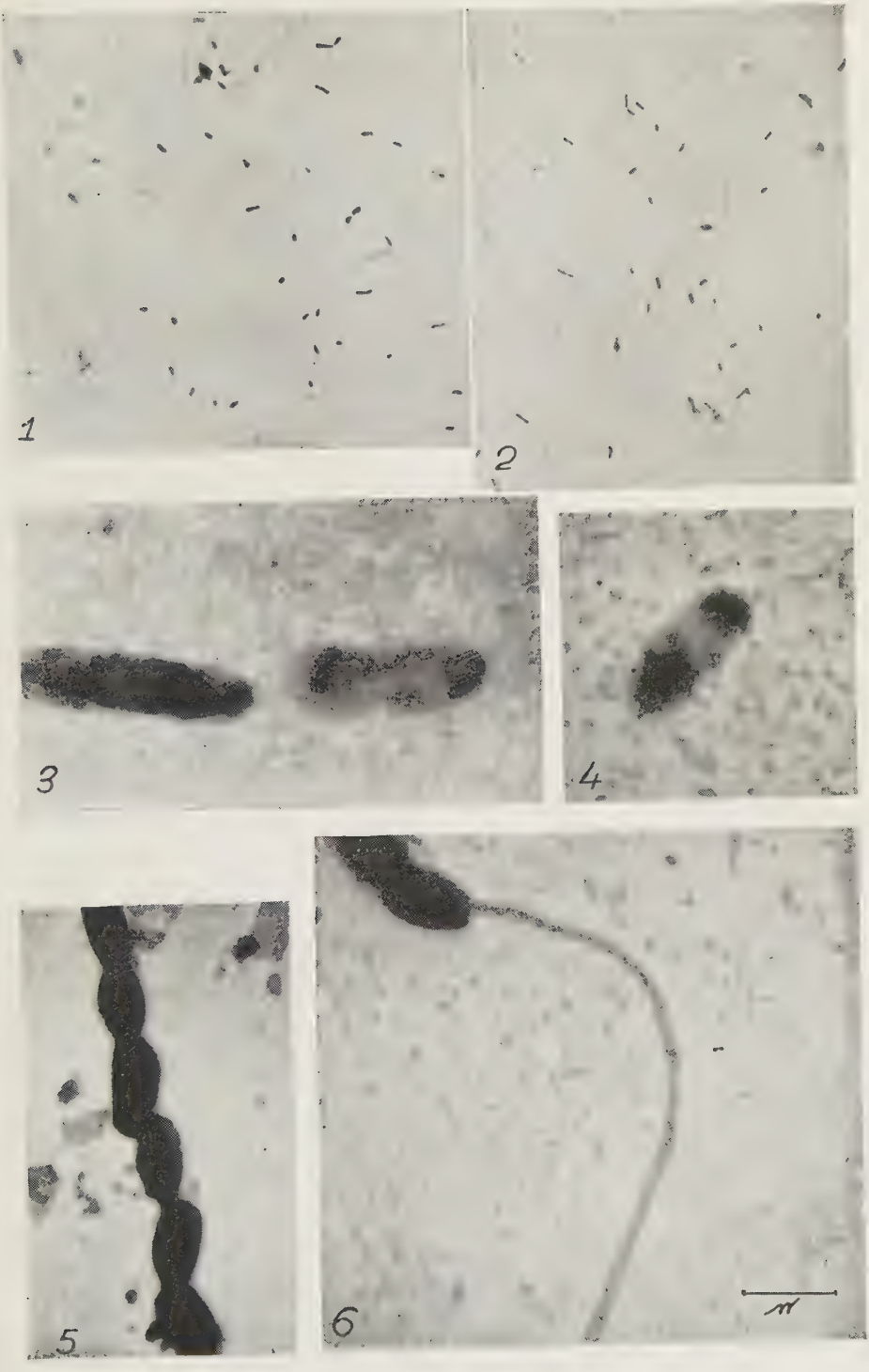
Kleczkowska, J. 1950. A study of phage-resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. J. Gen. Microbiol. 4, 298.

Lea, D. E. 1947. Actions of radiations on living cells. The Mac. Millan Co., New York, N. Y.

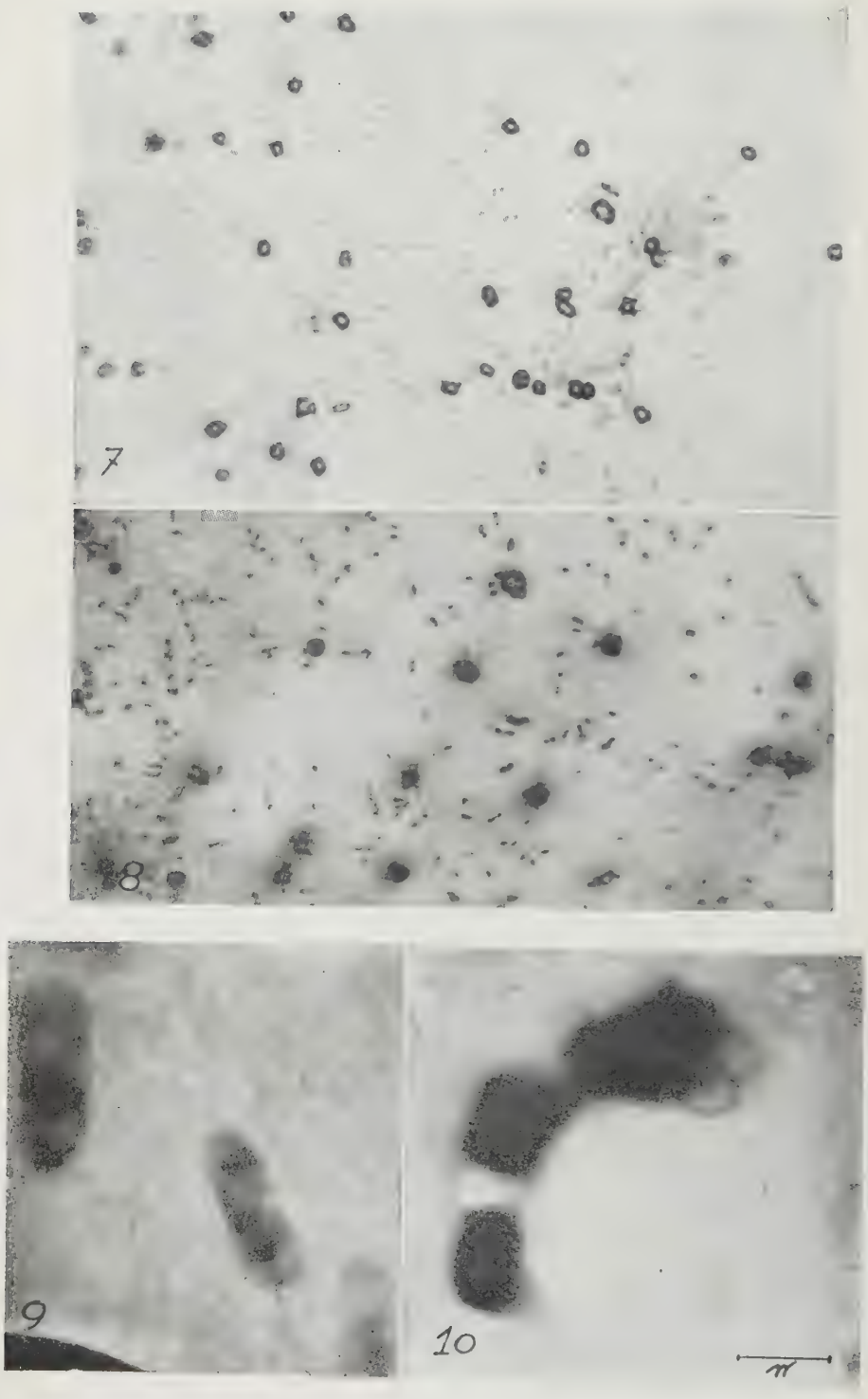
Max R. Zelle. 1955. Radiation induced mutations and their implications on the mechanismes of radiations effectes on bacteria. Bac. Rew., 19, 1-33-41.

Rahn, O. 1930. The erder of death of organisms larger than bacteria. J. Gen. Phisiol., 14, 315-337.

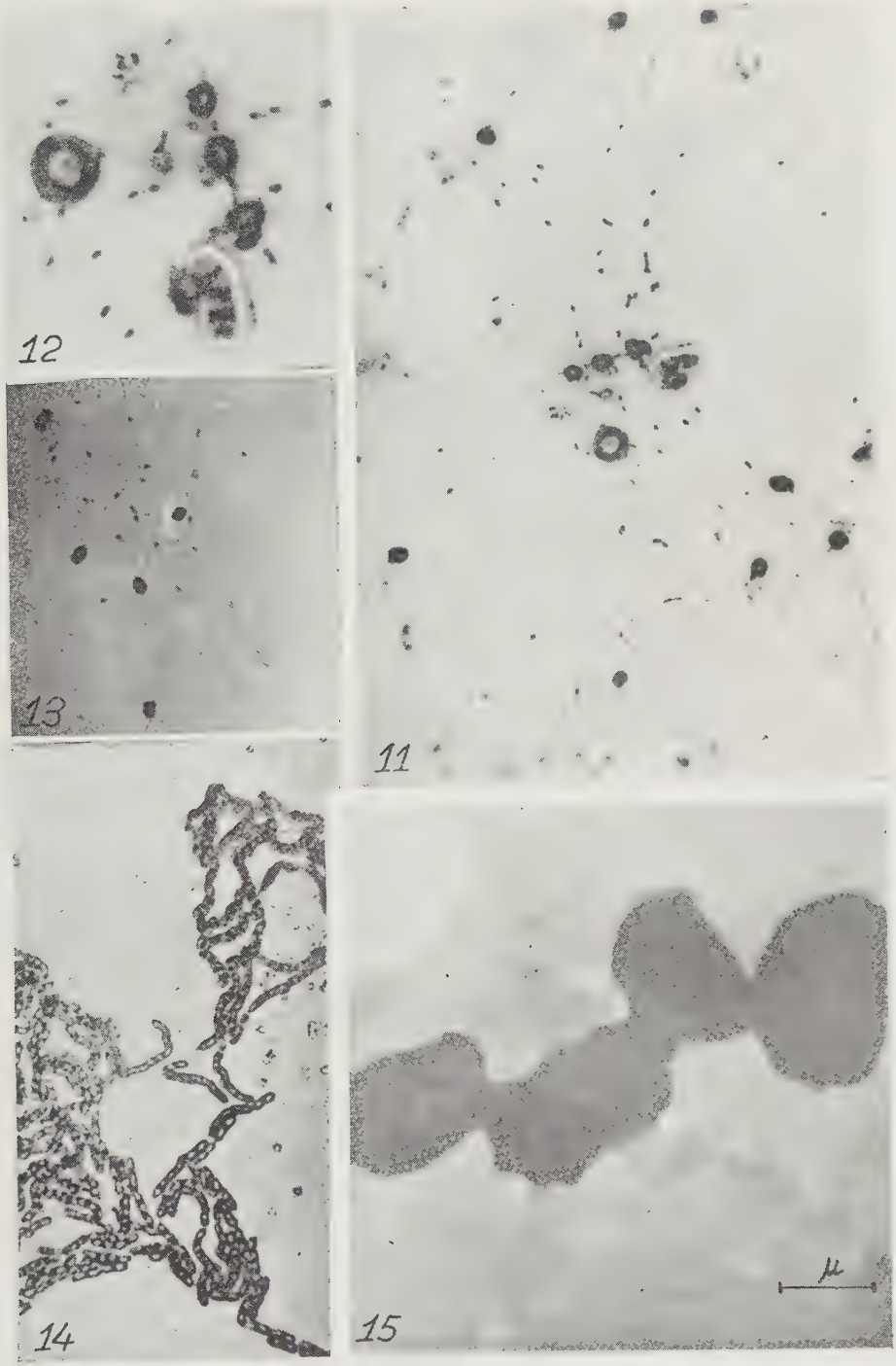
Zelle, M. R., and Hollaender, A. 1954. Effectes of radiation on bacteria. In Radiation biology. Vol. 2. Chapter 10. Edited bp Hollaender and Mc Graw Hill Book Co., New York, N. Y.



Fotos 1-6.



Fotos 7-10.



Fotos 11-15.

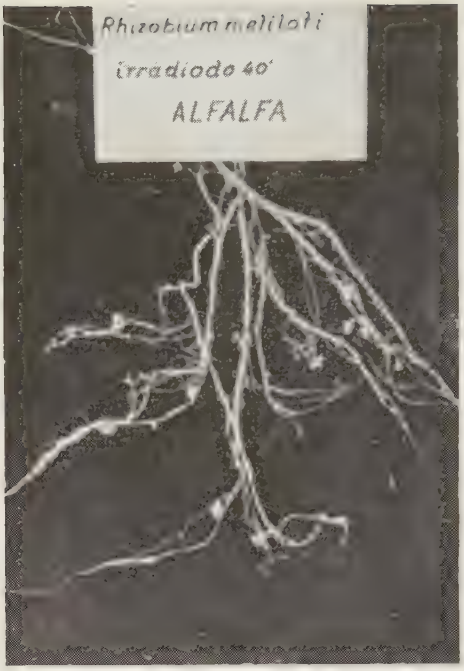


Foto 16.

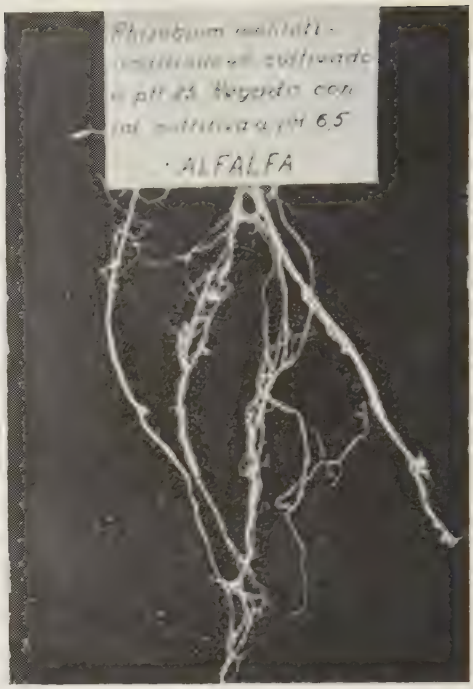


Foto 17.

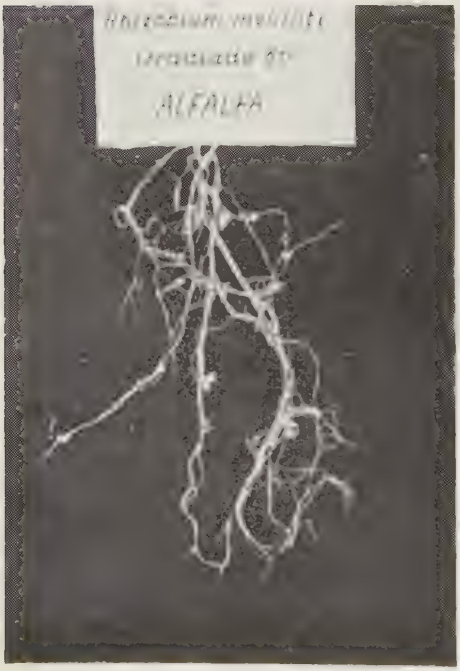


Foto 18.

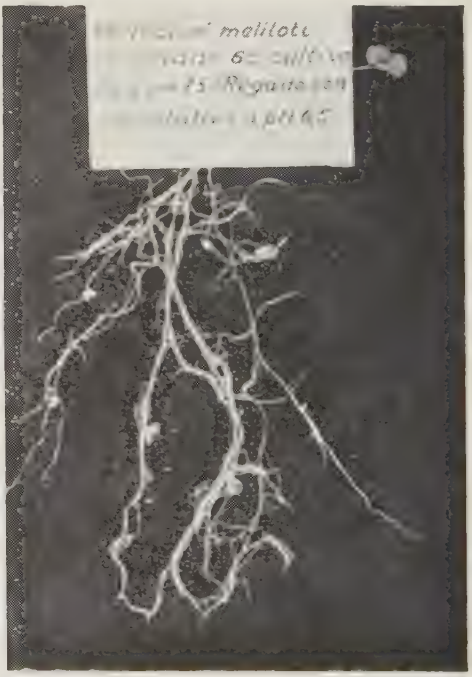


Foto 19.

C. S. I. C.
- INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

IDENTIFICACION DE BACTERIOFAGOS MEDIANTE TECNICAS SEROLOGICAS

I. Bacteriófagos aislados a partir de heces humanas.

POR

M. Luisa Alonso

A) INTRODUCCION

En esta nota, presentamos unos ensayos realizados mediante una técnica de tipo serológico para identificación de fagos, aplicándola a la determinación de virus obtenidos a partir de heces humanas procedentes de enfermos de afecciones intestinales de etiología no conocida.

Esta técnica, ideada por Bordet y Ciuca en 1921, ha sido utilizada por diferentes autores con las consiguientes modificaciones para investigaciones de este tipo, y son ya antiguas las publicaciones referentes a la antigenicidad de los fagos; así, Woilman (1925) encontró que los distintos bacteriófagos presentaban autonomía antigénica. Bais, y más tarde Burnet y Mc Kie, demuestran que entre los numerosos fagos del grupo coli-tífico-disentérico la acción neutralizante de los sueros permite distinguir doce grupos serológicos. D'Herelle y Eliava (1927) observan que la reacción fago-antifago es reversible en la mayoría de los casos, y que esta reacción parece seguir la ley de las proporciones definidas, según Otto y Munter (1922), o la de los porcentajes, según Andrewes y Elford (1933). El mecanismo de esta acción está basado, según las ideas de Burnet y colaboradores (1933), en que el corpúsculo bacteriófago posee dos variedades de recepción: A) y B) Sobre los primeros se fijan los anticuerpos neutralizantes, mientras que los segundos condicionan la fijación del fago sobre la bacteria. Kalmason, Hersey y Bronfenbrenner publican teorías acerca del aspecto cuantitativo de esta reacción.

Estos trabajos, que pueden considerarse los fundamentos teóricos de esta aplicación serológica de la investigación de fagos, recogen una serie de propiedades y características de la reacción que con la simplicidad de un esquema exponemos a continuación:

1. Los fagos, presentando carácter antigénico, son capaces de producir en el suero de los animales inoculados, además de los anticuerpos neutralizantes, otros anticuerpos distintos, y a veces precipitinas, aglutininas y sensibilizantes para los bacteriófagos.

2. Hay absoluta especificidad entre el fago y los anticuerpos del suero por él generados, aunque es posible que los antifagos producidos neutralicen a fagos considerados como vecinos muy cercanos tipológicamente, si bien esta neutralización es de título más bajo y no reversible.

3. Esta especificidad antigénica, mantenida a través de generaciones sucesivas, concede un gran valor a este método de clasificación e identificación de fagos mediante el empleo de sueros neutralizantes.

4. Fagos diferentes, activos sobre una misma bacteria, pueden dar en determinados casos anticuerpos distintos, no dando neutralización cruzada.

5. Esta reacción de neutralización es reversible en la mayoría de los casos y tiene lugar de un modo cuantitativo.

6. Los factores que pueden intervenir en el mecanismo de esta reacción son: la acción perjudicial del calor; temperaturas de 70 a 75° C. durante una hora desproveen al bacteriófago de su antigenicidad. Sin embargo, el formol, pese a su efecto inactivador sobre la propiedad lítica de los fagos, no solamente deja intactas sus propiedades—según comprobaron Muckenfuss (1928), Schultz y colaboradores (1929), Schultz y Gebhardt (1935) y Moriyama y Ohashi (1939)—, sino que aumenta su resistencia a la temperatura (Nicolle y Ducrest, 1948).

Esto es cuanto constituyen los antecedentes bibliográficos que en relación con este problema hemos tenido ocasión de consultar, quedándonos tan sólo pasar a la parte experimental, pero no lo haremos sin antes mencionar al profesor Nicolle, con quien hemos trabajado sobre temas con esto relacionados, y cuyos trabajos hemos tenido que consultar frecuentemente.

B) PARTE EXPERIMENTAL

I. *Material y muestras.*

a) Para este trabajo no se ha precisado de material especial, bastando tan sólo el material de uso diario en un laboratorio de Bacteriología.

b) Los gérmenes empleados han sido:

I. *Escherichia coli.*
II. *Salmonella typhi.*
III. *Salmonella paratyphi* A.
IV. *Salmonella paratyphi* B.

c) Heces humanas procedentes de enfermos con cuadro infeccioso instestinal de etiología desconocida.

II. *Técnicas empleadas.*

a) Para el aislamiento e identificación de bacteriófagos se han seguido las técnicas de uso actual en el laboratorio del profesor Nicolle del Instituto Pasteur, de París, cuya marcha esquemática indicamos a continuación.

Demostración de las propiedades (Lísicas).

Aislamiento de estos bacteriófagos (purificación).

Enriquecimiento.

Titulación.

Identificación. → Caracteres variables. → Gama de actividad.
→ Resistencia cruzada de cultivos secundarios.
→ Caracteres estables. → Neutralización por sueros antifagos.
→ Morfología y tamaño.
Frotamiento.

Las técnicas empleadas para ello han sido:

Para *identificación del fago*, siembra del filtrado procedente de las heces de cada uno de los enfermos estudiados junto con cultivos de los gérmenes mencionados anteriormente, sobre cuatro placas de Petri (una para cada germen).

Su *aislamiento* se hace a partir de una de las marcas (plages) bien aislada, y para su *enriquecimiento* se siembra este inóculo junto con una porción del cultivo inalterado que la rodea en 20 c. c. de caldo común, y se incuba durante tres horas a 37° C. Al cabo de este tiempo se filtra por bujía Chamberland L-3.

A partir de este filtrado se realiza la *titulación* de la siguiente manenera: *a)* sembrado en sábana sobre agar-peptonado de *Escherichia coli* a partir de una suspensión en solución salina de un cultivo en agar; *b)* después de secada esta siembra se depositan, sobre casillas previamente marcadas en la placa, una gota de filtrado puro y de cada una de las diluciones de éste, comprendidas entre 10^{-1} y 10^{-8}; *c)* incubación a 37° C. durante dieciocho a veinticuatro horas, y al cabo de este tiempo hacer la lectura de los resultados, anotando la dilución crítica, es decir, la mínima concentración de bacteriófago que produce lisis confluente.

Para la *identificación* nos hemos limitado tan sólo a los caracteres estables, y de ellos a la neutralización por sueros antifagos solamente.

b) Para la preparación de sueros se utiliza una solución antigénica a partir del filtrado de un cultivo de bacteriófago sobre caldo común (incubado a 37° durante tres horas), diluído al 1/6 en solución salina formolada al 2 por 1.000.

Esta solución antigénica es la que se inyecta a los conejos en cantidades de 50 c. c. por vía intraperitoneal durante cuatro días consecutivos. Al cabo de dos a tres semanas se practica una sangría de prueba, que se repite semanalmente de una a tres veces hasta comprobar si se alcanzó el título óptimo deseado, en cuyo caso se hace sangría a muerte y se determina el título final. Si no se alcanza el título deseado es necesario repetir las inyecciones, según se indicó anteriormente, hasta que esto se logre convenientemente.

c) La *titulación* de estos sueros comprende sencillamente unas pruebas de neutralización llevadas a cabo según indicamos:

A partir de las diluciones críticas de los bacteriófagos, obtenidas según se indicó anteriormente, y de los sueros diluídos a 10^{-1}, 10^{-2} y

10^{-3}, se preparan mezclas que han de permanecer en contacto veinticuatro horas a 37° C. para que sea posible la neutralización. Al cabo de este tiempo de incubación se deposita una gota de cada muestra sobre placas Petri, que previamente se sembraron con *E. coli* y se dividieron en seis parcelas. Tres de ellas se dedican a las mezclas neutralizadas que se estudian y otras tres a la dilución crítica del bacteriófago y las dos que le siguen en orden exponencial.

En la interpretación de estos resultados se precisa, para considerar que un suero tiene el título óptimo, que sea capaz de neutralizar el bacteriófago de forma que la aparición de marcas esté comprendida de 0 a 100 en relación inversamente proporcional a las diluciones de las mezclas. Y para lograr mayor claridad en esta exposición damos el esquema que sigue:

PRUEBAS	PARCELAS	DILUCIONES EMPLEADAS	RESULTADOS
Fagos puros.	1	10^{-4}	Lisis confluente (Cl)
	2	10^{-5}	Cl-
	3	10^{-6}	Aprox. 100 marcas
Mezclas fago-antifago.	4	10^{-1}	0 marcas
	5	10^{-2}	10 marcas aprox.
	6	10^{-3}	100 marcas aprox.

d) Después ya no queda más que realizar las *reacciones cruzadas*, para lo cual se acude a la técnica anterior, pero sustituyendo el suero anti-fago específico por los otros sueros anti-fagos obtenidos, y con ello se logra conocer las relaciones inmunológicas que entre los fagos pudieran existir.

III. *Casos clínicos examinados.*

Un grupo de 24 casos de infección intestinal, seleccionados por lo atípico de su caracterización clínica de laboratorio, pese a lo característico de sus cuadros clínicos, ha sido estudiado desde nuestro punto de vista y hemos aislado el basfago en siete de estos casos.

Caso núm. 1.

—M. O..., niño de doce años, que presenta síntomas de fiebre, náuseas, vómitos, diarrea, administrándosele penicilina y estreptomicina, sin que remitiera la fiebre. Hemocultivo negativo. Con aureomicina cede algo el cuadro febril, sin que llegue a desaparecer totalmente. Aglutinaciones frente al *Salmonella typhi, S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B y *Brucella melitensis* negativas; pese a estos resultados, se le administra cloromicetina, con lo que se logra la curación de la enfermedad.

Caso núm. 2.

—C. R..., muchado de dieciséis años, con síntomas parecidos al anterior. Hemocultivo negativo. No ceden los síntomas frente a la asociación retardada penicilina-estreptomicina. Aglutinaciones *S. typhi* —, *S. para-tiphi* A —, *S. para-tiphi* B + al 1/40 y *B. melitensis* —. Curado con cloromicetina.

Caso núm. 3.

—F. N..., hombre de veintisiete años, con fiebre y vómitos que no desaparecen con penicilina. Aglutinaciones negativas; a pesar de ello, se le administra cloromicetina y se cura.

Caso núm. 4.

—C. U..., muchacho de quince años. Hemocultivo negativo. Aglutinación × para *S. typhi* al 1/250 y para *S. para-typhi* A al 1/100, negativos los demás. Curado con cloromicetina.

Caso núm. 5.

—T. L..., señora de sesenta y tres años, se le presenta bruscamente hemorragia intestinal en melena. Se trata con antihemorrágicos, vitaminas y asociación de penicilina y estreptomicina; consecuencia de esto es un proceso febril interminente que no se corta por los antibióticos ante-

riores. Hemocultivo negativo. Aglutinación positiva al *S. para-tiphy* B al 1/80, y negativos todos los demás.

Caso núm. 6.

—T. C..., niña de siete años, con cuadro febril que hace sospechar infección intestinal. Hemocultivo negativo. Aglutinaciones negativas; pero, a pesar de ello, se la administra cloromicetina y desaparecen los síntomas.

Caso núm. 7.

—G. A..., niño de cinco años, con aglutinaciones negativas y cuadro clínico análogo al anterior.

IV. *Cuadros y resultados.*

A continuación exponemos en el cuadro núm. 1 la gama de actividad de los bacteriófagos aislados a partir de los filtrados de heces en estos enfermos, frente a los cuatro gérmenes que se consideran, y cuya numeración fué dada al principio de esta parte experimental. En el cuadro se emplea el signo Cl para indicar «lisis confluente», Cl^- cuando hay lisis «casi confluente», y mediante signos + se da idea del número de marcas aproximadamente.

CUADRO NUM. 1

GAMA DE ACTIVIDAD DE LOS BACTERIÓFAGOS

BACTERIÓFAGOS		1				2				3				4				5				6				7			
Gérmenes		I	II	III	IV	I	II	III	IV	1	II	III	IV	1	II	III	IV	1	II	III	IV	1	II	III	IV	1	II	III	IV
Diluciones de los fagos	Puro	Cl	0	0	0	Cl	0	0	0	Cl	0	0	0	Cl	Cl-	0	0	Cl	0	0	0	Cl	0	0	Cl-	Cl	0	0	0
	10^{-1}	Cl				Cl				Cl				Cl	+			Cl				Cl			11	Cl			
	10^{-2}	Cl-				Cl				Cl				Cl	2			Cl-				+++			0	Cl-			
	10^{-3}	+++				Cl				+++				Cl-	0			+				32				++			
	10^{-4}	+				++				10				++				1				2				23			
	10^{-5}	3				2				0				5				0				0				1			
	10^{-6}	0				0								0												0			
	10^{-7}	0																											
	10^{-8}	0																											

En todas estas experiencias hemos aislado exclusivamente los fagos específicos de la cepa de *E. coli* empleada en la determinación previa de la gama de actividad, y también con esta cepa hemos efectuado el resto de las experiencias.

Al cuadro 2 corresponden los resultados obtenidos en la titulación de los bacteriófagos aislados, encerrando en círculos los signos Cl, que

CUADRO NUM. 2

TITULACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS SOBRE «E. COLI»

DILUCIONES	Puro	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Fago n.º 1	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl⁻	+++	0	1	0
Fago n.º 2	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl⁻	+	15	0
Fago n.º 3	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	++	++	0	
Fago n.º 4	Cl	Cl	Cl	Cl	+++	21	0		
Fago n.º 5	Cl	Cl	Cl	Cl⁻	+	8	3		
Fago n.º 6	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	+	22	0	
Fago n.º 7	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	+++	+	7

corresponden a la dilución crítica de cada uno. Estas diluciones críticas son las que hemos de utilizar más tarde en las pruebas de titulación de los sueros antifagos correspondientes y en las pruebas de neutralización cruzadas que se recogen en el cuadro núm. 3.

CUADRO NUM. 3

PRUEBAS DE NEUTRALIZACIÓN CRUZADAS ENTRE LOS FAGOS ESTUDIADOS Y LOS SUEROS ANTI-FAGOS OBTENIDOS

SUEROS ANTI-FAGO	I	II	III	IV	V	VI	VII
Fago n.º 1	+	+	—	+	—	—	—
Fago n.º 2	+	+	—	+	—	—	—
Fago n.º 3	—	—	+	—	+	—	—
Fago n.º 4	—	—	—	+	—	—	—
Fago n.º 5	—	—	+	—	+	—	—
Fago n.º 6	—	—	—	—	—	+	+
Fago n.º 7	—	—	—	—	—	+	+

V. *Interpretación y discusión de los resultados.*

Antes de iniciar esta discusión aclararemos que los fagos están denominados por números que se corresponden con el del caso clínico del que proceden, así como los sueros anti-fagos.

Hecha esta aclaración, pasaremos a examinar el cuadro núm. 3, y así podemos ver que los bacteriófagos 1 y 2 son idénticos porque dan reacciones cruzadas entre sí, y pueden ser considerados con «parentesco próximo» con el núm. 4, ya que dan reacción con el anti-fago 4.

Los fagos 3 y 5 son idénticos entre sí, por la misma razón dada anteriormente, pero diferentes de todos los demás.

El fago núm. 4 es distinto de todos los demás y «próximo pariente» de los fagos 1 y 2. Sólo da reacción frente al anti-fago específico núm. 4.

Los fagos 6 y 7, idénticos entre sí por dar reacciones cruzadas, son a su vez distintos de todos los demás. Hubiera sido interesante continuar la investigación bacteriológica de estos dos casos, ya que probablemente se trata de dos gastro-enteritis infantiles.

C) RESUMEN

Generalmente en los casos de infección intestinal sospechosa de ser de naturaleza salmonelósica, se investiga el aislamiento de bacteriófagos y su tipación enfrente de los tipos internacionales con la finalidad de futuras deducciones y aplicaciones epidemiológicas y de fisiología bacteriana.

Ante los casos, en especial, de las gastroenteritis infantiles cuya etiología se sospecha es de naturaleza de infección por *E. coli*, los tipos de bacterias y bacteriófagos no han sido aún establecidos. Nuestro trabajo no tiene más objeto que buscar y relacionar bacteriófagos en un terreno casi virgen, en busca de estos posibles tipos, de sus relaciones y deducciones como en las *Salmonellas*.

Se aíslan siete bacteriófagos a partir de heces humanas procedentes de enfermos con infección intestinal.

Se identifican como fagos de *E. Coli*.

Se preparan los sueros antifago correspondientes.

Se estudian y establecen mediante pruebas de neutralización las relaciones que guardan entre sí estos fagos.

D) SUMMARY

Seven bacteriophages have been isolated from feces of human patients suffering of intestinal infection.

They were identified as «fagos» of *E. coli*

The antiphago correspondent serums have been prepared.

Experiments on neutralization have been worked out in order to establish the mutual relations between these fagos.

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA DE MADRID

NUEVA TECNICA PARA LA IDENTIFICACION DEL *PSEUDOMONAS SAVASTANOI*

(Conclusión.)

POR

R. BELTRÁ

RESULTADOS

Microscopia óptica.

Las estirpes de *Pseudomonas savastanoi* aisladas de los tumores de olivo fueron teñidas por las técnicas usuales en Microbiología y estudiadas microscópicamente, así como también los *Pseudomonas savastanoi* números 64, 206, 207 y 208. *Pseudomonas pisi* 123, *Pseudomonas marginalis* 289, *Pseudomonas syringae* 294 y *Pseudomonas medicáginis* var: *phaseolícola* 52.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

RESULTADOS DE MICROSCOPIA OPTICA

Estirpes de *Pseudomonas*	Tinción de Gram	Tinción de esporas por método de Wirtz	Tinción de cápsulas por método de Antony	Tinción de flagelos por met. de Gray Loeffler y Casares Gil
Ps. savastanoi 1 (2)...	—	—	—	+
Id. 2 (2)	—	—	—	+
Id. 2 (4)	—	—	—	+
Id. 12 (3)	—	—	—	+
Id. 12 (14)...	—	—	—	+
Id. 13 (2)	—	—	—	+
Id. 14 (4)...	—	—	—	+

Estirpes de *Pscudomonas*	Tinción de Gram	Tinción de Wirtz de esporas por método	Tinción de cápsulas por método de Antony	Tinción de flagelos por met. de Gray Loeffler y Casares Gil
Id. 64	—	—	—	+
Id. 206	—	—	—	+
Id. 207	—	—	—	+
Id. 208	—	—	—	+
Ps. pisi 123	—	—	—	+
Ps. marginalis 289 ...	—	—	—	+
Ps. syringae 294... ...	—	—	—	+
Ps. medicaginis 92 ...	—	—	—	+

En estas experiencias, algunas de las muestras de olivo recogidas se han utilizado para hacer pruebas previas de aislamiento e identificación, y los resultados que damos en esta parte del trabajo corresponden solamente a parte de las muestras ensayadas, tales como las números 1, 2, 9, 12, 13 y 14.

Con las muestras 9, 12 y 14 hemos hecho aislamientos bacterianos partiendo de tumores jóvenes y tumores viejos. Hemos podido apreciar que las suspensiones procedentes de tumores viejos, cuando se cultivan en medios sólidos, producen mayor número de colonias de bacterias saprofitas que aquellas otras suspensiones procedentes de tumores jóvenes lo cual corrobora la idea de Smith y Erwin F. (1905).

En los distintos medios, tales como azúcares, salicina, glicerina, etcétera, que consignamos en la parte experimental, se sembraron los cultivos puros obtenidos de las suspensiones de los tumores y se han hecho dos lecturas a los siete días de sembrados los medios y a los dieciocho días, o sea diez días después de la primera lectura.

Aunque, según diversos autores, se deben observar los resultados durante veintiocho días, cosa que nosotros hicimos, no hemos advertido cambios apreciables en los últimos días, motivo por el cual sólo consignamos los resultados obtenidos en las dos primeras lecturas correspondientes a los dieciocho primeros días de incubación de los medios sembrados a 25° C.

MUESTRA NUM. 1

PRIMERA LECTURA. A LOS SIETE DÍAS DE INOCULADOS Y EN ESTUFA A 24° C.

AGAR-GLUCOSADO		1 (1) Crecimien. blanco abundante	1 (2) Crecimien. blanco transparen.	1 (3) Crecimien. blanco crema
Salicina.	fermenta.	A	—	—
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	—	+
Xilosa.	fermenta.	A	A	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	+
Sacarosa	fermenta.	A	A	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	—	—
Galactosa.	fermenta.	A	A	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	—	+	+
Glucosa.	fermenta.	A	A	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	—
Lactosa.	fermenta.	—	—	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	—
Maltosa.	fermenta.	A	—	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	+
Glicerina.	fermenta.	A	A	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	—	+	+
Gelatina.	licuefac.	+	—	+
	crecimien.	+	—	—
Leche tornasolada.	acidificac.	+	—	—
	alcaliniza.	—	—	—
	reducción	—	+	—

MUESTRA NUM. 1

SEGUNDA LECTURA, A LOS DIECIOCHO DÍAS

AGAR-GLUCOSADO		1 (1) Crecimien. blanco abundante	1 (2) Crecimien. blanco transparen.	1 (3) Crecimien. blanco crema abundan.
Salicina.	fermenta.	A	—	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	+
Xilosa.	fermenta.	A	A	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	+
Sacarosa	fermenta.	A	A	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	+
Galactosa.	fermenta.	A	A	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	+
Glucosa.	fermenta.	A	A	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	+
Lactosa.	fermenta.	A	—	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	+
Maltosa.	fermenta.	A	—	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	+	+	+
Glicerina.	fermenta.	A	A	A
	gas.	—	—	—
	crecimien.	—	+	+
Gelatina.	licuefac.	+	—	+
	crecimien.	+	—	—
Leche tornasolada.	acidificac.	+	—	+
	alcaliniza.	—	+	—
	reducción	—	—	—

MUESTRA NUM. 2

PRIMERA LECTURA. A LOS SIETE DÍAS DE INOCULADOS Y EN ESTUFA A 24° C.

AGAR-GLUCOSADO		2 (1) Crec. Blanco fluorescente	2 (2) Crecimien. Blanco fluores.	2 (3) Crecimien. amarillo	2 (4) Crecimien. blan. irisado crema
Salicina.	fermenta.	—	—	A	—
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	—	—	—	—
Xilosa.	fermenta.	A	A	A	A
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	+	+	+	+
Sacarosa	fermenta.	A	A	A	—
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	—	—	+	—
Galactosa.	fermenta.	A	A	A	A
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	—	—	—	+
Glucosa.	fermenta.	A	A	A	A
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	—	—	+	+
Lactosa.	fermenta.	—	—	—	—
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	—	—	+	+
Maltosa.	fermenta.	—	—	A	—
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	—	—	—	—
Glicerina.	fermenta.	A	A	A	A
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	+	+	+	—
Gelatina.	licuefac.	—	—	+	—
	crecimien.	—	—	—	—
Leche tornasolada.	acidificac.	—	—	+	—
	alcaliniza.	+	+	—	+
	reducción	—	—	—	—

MUESTRA NUM. 2

SEGUNDA LECTURA, A LOS DIECIOCHO DÍAS

AGAR-GLUCOSADO		2 (1) Crec. Blanco fluorescente	2 (2) Crecimien. blanco fluores.	2 (3) Crecimien. amarillo abundante	2 (4) Crecimien. blanco irisado
Salicina.	fermenta.	—	—	A	—
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	+	+	+	+
Xilosa.	fermenta.	A	A	A	A
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	+	+	+	+
Sacarosa	fermenta.	A	A	A	A
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	+	+	+	—
Galactosa.	fermenta.	A	A	A	A
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	+	+	—	+
Glucosa.	fermenta.	A	A	A	A
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	+	+	+	+
Lactosa.	fermenta.	—	—	—	—
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	+	+	+	+
Maltosa.	fermenta.	—	—	A	—
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	+	+	—	+
Glicerina.	fermenta.	A	A	A	A
	gas.	—	—	—	—
	crecimien.	+	+	+	—
Gelatina.	licuefac.	—	—	+	—
	crecimien.	—	—	+	—
Leche tornasolada.	acidificac.	—	—	+	—
	alcaliniza.	+	+	—	+
	reducción	—	—	—	+

MUESTRA

PRIMERA

HECHA A LOS VEINTE DÍAS DE SEMBRADOS

			9 (1)	9 (2)	9 (3)	9 (4)	9 (5)	9 (6)
	AGAR-GLUCOSA-LEVADURA		Crecimiento blanco cremoso brillante iridiscente.	Crecimiento gomoso abundante.	Crecimiento gomoso abundante.	Crecimiento blanco amarillo irisdiscente.	Crecimiento rugoso desprendiendo sus colonias como placas.	Crecimiento blanco sucio iridiscente.
	CALDO		Velo y crecimiento.	Velo y crecimiento.	Velo y crecimiento.	Velo y crecimiento.	Velo y crecimiento.	Depósito filamentoso.
P.B.C.	Salicina...	Fermentación ..	A	A	—	—	—	—
		Gas..	—	—	—	—	—	—
		Crecimiento.. ...	+	—	—	—	—	—
A.B.T.	Salicina...	Fermentación ..	A	A	A	—	A	A
		Gas..	—	—	—	—	—	—
		Crecimiento.. ...	+	—	—	—	—	—
P.B.C.	Lactosa...	Fermentación ..	A	A	A	A	—	A
		Gas..	—	—	—	—	—	—
		Crecimiento.. ...	+	—	—	+	—	—
A.B.T.	Lactosa...	Fermentación ..	A	A	A	A	—	A
		Gas..	—	—	—	—	—	—
		Crecimiento.. ...	—	—	+	+	—	—
P.B.C.	Glucosa...	Fermentación ..	A	A	A	A	—	A
		Gas..	—	—	—	—	—	—
		Crecimiento.. ...	—	+	—	—	—	—
A.B.T.	Glucosa... ...	Fermentación ..	A	A	A	A	—	A
		Gas..	—	—	—	—	—	—
		Crecimiento.. ...	+	+	—	—	—	—
P.B.C.	Sacarosa.. ...	Fermentación ..	A	A	—	—	—	A
		Gas..	—	—	—	—	—	—
		Crecimiento.. ...	+	+	—	—	—	—
A.B.T.	Sacarosa.. ...	Fermentación ..	A	A	A	—	—	A
		Gas..	—	—	—	—	—	—
		Crecimiento.. ...	+	+	—	—	—	—

P. B. C. = púrpura de bromocresol. A. B. T. = azul de bromotimol.

CTURA

OS MEDIOS E INCUBADOS A 25° C

9 (7)						9 (8)						9 (9)						9 (10)						9 (11)						9 (12)						9 (13)						9 (14)					
Crecimiento blanco crema.						Crecimiento aspecto gomoso.						Crecimiento blanco amarillo iridiscente.						Crecimiento blanco verdoso iridiscente.						Crecimiento blanco crema iridiscente.						Crecimiento amarillo abundante.						Crecimiento blanco pardusco.						Crecimiento blanco crema gelatinoso.						Crecimiento blanco escaso.					
Poco crecimiento.						Mucho crecimiento.						Velo y crecimiento.						Velo y crecimiento.						Velo y crecimiento.						Mucho crecimiento.						Poco crecimiento.						Velo y crecimiento.						Poco crecimiento.					
A						A						A						—						—						A						—						A						A					
						+																																										
						—						+																																			
A						A						A						—						—						A						—						A						—					
+						+						—																		+																	
						—																																										
A						A						A						A						—						A						—						A						—					
						+																																										
						—																																										
A						A						A						A						—						A						—						A						A					
						+																																										
						—																																										
A						A						A						A						—						A						—						A						A					
						+																																										
						—																																										
A						A						A						A						—						A						—						A						—					
						+																																										
						—																																										
A						A						A						—						—						A						—						A						—					
						+																																										
						—																																										
A						A						A						—						—						A						—						A						—					
						+																																										
						—																																										

MUESTRA

SEGUNDA

HECHA A LOS VEINTE DÍAS DE SEMBRADOS

			9 (1)	9 (2)	9 (3)	9 (4)	9 (5)	9 (6)
AGAR-GLUCOSA-LEVADURA			Crecimiento blanco cremoso brillante iridiscente.	Crecimiento gomoso abundante.	Crecimiento gomoso abundante.	Crecimiento blanco amarillo iridiscente.	Crecimiento rugoso desprendiendo sus colonias como placas.	Crecimiento blanco sucio iridiscente.
CALDO			Velo y crecimiento.	Velo y crecimiento.	Velo y crecimiento.	Velo y crecimiento.	Velo y crecimiento.	Depósito filamentoso.
P. B. C.	Maltosa... ..	Fermentación ..	A	A	A	A	A	A
		Gas..	—	—	—	—	—	—
		Crecimiento.. ...	—	+	+	—	—	+
A. B. T.	Maltosa... ..	Fermentación ..	A	A	A	A	A	A
		Gas..	—	—	—	—	—	—
		Crecimiento.. ...	+	+	+	—	—	—
	Leche tornasolada..	Acidificación. ...	—	—	—	+	—	—
		Alcalinización ...	—	—	—	—	—	—
		Reducción	+	+	—	—	+	—
Almidón.			H	H	H	H	H	H
N H			+	+	+	+	+	+
S H			—	+	+	+	+	+
N O			—	—	—	+	+	+
Indol.			—	+	—	—	+	+
Gelatina. Licuefacción.			—	—	—	—	+	+
Patata.			Marrón.	Marrón.	Amarillo crema.	Blanco brillante.	Amarillo f. velo.	Marrón ligero.

P. B. C. = púrpura de bromocresol. A. B. T. = azul de bromotimol.

UM. 9

CTURA

S MEDIOS E INCUBADOS A 25° C

9 (7)	9 (8)	9 (9)	9 (10)	9 (11)	9 (12)	9 (13)	9 (14)	
Crecimiento blanco crema.	Crecimiento aspecto gomoso.	Crecimiento blanco amarillo iridiscente.	Crecimiento blanco verdoso iridiscente.	Crecimiento blanco crema iridiscente.	Crecimiento amarillo abundante.	Crecimiento blanco parduzco.	Crecimiento blanco crema gelatinoso.	Crecimiento blanco escaso.
Poco crecimiento.	Mucho crecimiento.	Velo y crecimiento.	Velo y crecimiento.	Velo y crecimiento.	Mucho crecimiento.	Poco crecimiento.	Velo y crecimiento.	Poco crecimiento.
A — —	A — +	A — —	— — +	— — —	A — +	— — —	A — —	— — —
A — —	A + +	A — —	A — —	A — —	A — —	— — —	A — —	— — —
— — —	+ — +	— — —	— + +	— + +	+ — +	— — —	— + +	— — —
H	H	H	H	H	H	H	H	H
+	+	+	+	+	+	—	+	—
—	+	—	—	—	—	—	+	—
+	+	+	—	—	—	—	+	—
—	—	—	—	—	—	—	+	—
—	—	—	—	—	—	+	—	—
Amarillo.	Amarillo.	Amarillo.	Blanco cremoso.	Blanco oscuro cremº.	Amarillo limón.	Amarillo claro.	Amarillo claro.	Amarillo claro.

MUESTRA

PRIMERA

EN ESTA SERIE LA PRIMERA LECTURA SE HIZO SIETE

AGAR-GLUCOSADO		12 (1) Crecimiento amarillo abundante.	12 (2) Crecimiento blanco crema con fluorescencia verdosa.	12 (3) Crecimiento amarillo oro.	12 (4) Crecimiento amarillo abunda color yema.	12 (5) Crecimiento crema viscoso.
Salicina	Fermentación ..	—	—	A	A	—
	Gas..	—	—	—	—	—
	Crecimiento.. ...	+	—	+	+	—
Xilosa	Fermentación ..	A	A	A	A	A
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	+	+
Sacarosa	Fermentación ..	A	A	A	A	A
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	+	—
Galactosa	Fermentación ..	—	A	A	A	A
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	+	—
Glucosa...	Fermentación ..	A	A	A	A	A
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	—	+	+
Lactosa...	Fermentación ..	—	—	—	A	—
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	—	+	—	+	—
Maltosa...	Fermentación ..	A	—	A	A	A
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	+	+
Glicerina	Fermentación ..	—	A	A	A	A
	Gas..	—	—	—	—	—
	Crecimiento.. ...	+	—	+	—	+
Gelatina	Licuefacción. ...	+	—	+	—	—
	Crecimiento.. ...	+	—	+	—	+
Leche tornasolada	Acidificación. ...	+	—	+	—	+
	Alcalinización ...	—	+	—	—	—
	Reducción	—	+	—	—	—

ECTURA

AS DESPUÉS DE HABER SIDO INOCULADOS LOS MEDIOS

12 (6)	12 (7)	12 (8)	12 (9)	12 (10)	12 (11)	12 (12)	12 (13)	12 (14)
Crecimiento blanco con fluorescencia.	Crecimiento abundante amar. claro viscoso.	Crecimiento blanco cremoso.	Crecimiento abundante yema Irisaciones.	Crecimiento amarillo cremoso.	Crecimiento blanco abundan fluorescencia.	Poco crecimient blanco.	Crecimiento amarillo claro abundante.	Crecimiento blanco cremoso con irisaciones.
—	—	A	A	A	—	A	—	—
—	—	+	—	—	—	—	—	—
—	+	+	—	+	—	+	—	+
A	—	A	A	A	A	—	—	A
—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	+	+	+	—	—	+
A	A	A	A	A	A	A	—	A
—	—	+	—	—	—	—	—	—
+	—	+	+	+	—	—	—	+
A	A	A	A	A	A	—	A	A
—	—	+	—	—	—	—	—	—
—	+	+	+	+	—	+	+	+
A	A	A	A	A	A	A	A	A
—	—	+	—	—	—	—	—	—
+	—	+	+	+	+	+	+	+
—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	+	+	+	—	—	+	—
—	+	+	+	—	—	—	—	—
+	—	—	—	—	+	—	—	+
—	—	—	—	—	—	—	—	+

AGAR-GLUCÓSADO		12 (1) Crecimiento amarillo abundante.	12 (2) Crecimiento blanco crema con fluorescencia.	12 (3) Crecimiento amarillo cro abundante.	12 (4) Crecimiento amarillo abund. color yema.	12 (5) Crecimiento crema viscoso.
Salicina	Fermentación ..	A	—	A	A	A
	Gas..	—	—	—	—	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	+	—
Xilosa	Fermentación ..	A	A	A	A	A
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	+	—
Sacarosa	Fermentación ..	A	A	A	A	A
	Gas..	—	—	—	—	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	+	+
Galactosa	Fermentación ..	A	A	A	A	A
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	+	+
Glucosa...	Fermentación ..	A	A	A	A	A
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	+	+
Lactosa...	Fermentación ..	A	—	—	A	—
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	—	+	+
Maltosa...	Fermentación ..	A	—	A	A	A
	Gas..	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	+	+
Glicerina	Fermentación ..	A	A	A	A	A
	Gas	—	—	—	+	—
	Crecimiento.. ...	+	+	+	—	+
Gelatina	Licuefacción. ...	+	—	+	+	—
	Crecimiento.. ...	+	—	+	+	+
Leche tornasolada	Acidificación. ...	+	—	+	+	+
	Alcalinización ...	—	+	—	—	—
	Reducción... ...	+	+	—	—	—

NUM. 12

LECTURA

SEA A LOS DIECIOCHO DÍAS DE INOCULADOS LOS MEDIOS

12 (6)	12 (7)	12 (8)	12 (9)	12 (10)	12 (11)	12 (12)	12 (13)	12 (14)
Crecimiento blanco con fluorescencia.	Crecimiento abundante amar claro viscoso.	Crecimiento blanco cremoso.	Crecimiento abundante yem. Irisaciones.	Crecimiento amarillo cremoso.	Crecimiento blanco abundan fluorescencia.	Poco crecimient blanco.	Crecimiento amarillo claro abundante.	Crecimiento blanco cremoso con irisaciones.
— — +	A — +	A + +	A — —	A — +	— — +	A — +	A — +	— — +
A — +	— — —	A + +	A — +	A — +	A — +	A — +	A — +	A — +
A — +	A + —	A + +	A — +	A — +	A — +	A — +	A — —	A — +
A — +	A — +	A + +	A — +	A — +	A — +	A — +	A — +	A — +
A — +	A — +	A + +	A — +	A — +	A — +	A — +	A — +	A — +
— — +	A — +	A + +	— — +	— — —	— — +	A — +	A — +	— — +
— — —	A — +	A + +	A — +	A — +	— — +	A — +	A — +	— — +
A — +	A — +	A + +	A — +	A — +	A — +	A — —	A — —	A — +
— —	— +	+ —	+ —	+ —	— —	— +	+ +	— —
— + +	+ — +	+ — —	+ — +	+ — —	— + +	+ — —	+ — +	— + +

MUESTRA NUM. 12 (SEGUNDO AISLAMIENTO)

PRIMERA LECTURA. A LOS SIETE DÍAS DE INOCULADOS Y EN ESTUFA A 24° C.

AGAR-GLUCOSADO		12 (1) Crecimien. amarillo abundante	12 (2) Crecimien. blanco crema	12 (3) Crecimien. blanco irisado.
Salicina.	Fermentación.	A	A	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	—
Xilosa.	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	—	+	+
Sacarosa.	Fermentación.	—	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	—	+	—
Galactosa.	Fermentación.	A	—	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	—
Glucosa.	Fermentación.	A	A	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	—	+	—
Lactosa.	Fermentación.	A	—	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	—	—
Maltosa.	Fermentación.	A	—	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	—
Glicerina.	Fermentación.	—	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	—	+	+
Gelatina.	Licuefacción	+	+	—
	Crecimiento.	—	—	—
Leche tornasolada.	Acidificación.	+	—	—
	Alcalinización.	—	—	+
	Reducción.	—	—	—

MUESTRA NUM 12 (SEGUNDO AISLAMIENTO)

SEGUNDA LECTURA. A LOS DIECIOCHO DÍAS

AGAR-GLUCOSADO		12 (1) Crecimien. amarillo abundante	12 (2) Crecimien. blanco crema	12 (3) Crecimien. blanco irisado.
Salicina.	Fermentación.	A	A	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	—
Xilosa.	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	—	+	+
Sacarosa.	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	—
Galactosa.	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Glucosa.	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	—
Lactosa.	Fermentación.	A	A	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	—	—
Maltosa.	Fermentación.	A	A	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	—
Glicerina.	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	—	+	+
Gelatina.	Licuefacción	+	+	—
	Crecimiento.	+	—	—
Leche tornasolada.	Acidificación.	+	+	—
	Alcalinización.	—	—	+
	Reducción.	—	—	+

MUESTRA NUM. 13

PRIMERA LECTURA. A LOS SIETE DÍAS DE INOCULADOS Y EN ESTUFA A 24° C.

AGAR-GLUCOSADO		13 (1) Crecimiento blanco ocre abundante	13 (2) Crecimiento blanco fluorescente
Salicina.	Fermentación.	A	—
	Gas.	—	—
	Crecimiento.	+	—
Xilosa.	Fermentación.	A	A
	Gas.	+	—
	Crecimiento.	+	+
Sacarosa.	Fermentación.	A	A
	Gas.	+	—
	Crecimiento.	+	—
Galactosa.	Fermentación.	A	A
	Gas.	+	—
	Crecimiento.	+	+
Glucosa.	Fermentación.	A	A
	Gas.	+	—
	Crecimiento.	+	—
Lactosa.	Fermentación.	A	—
	Gas.	—	—
	Crecimiento.	+	+
Maltosa.	Fermentación.	A	—
	Gas.	+	—
	Crecimiento.	+	—
Glicerina.	Fermentación.	A	A
	Gas.	—	—
	Crecimiento.	+	+
Gelatina.	Licuefacción.	+	—
	Crecimiento.	—	—
Leche tornasolada.	Acidificación.	+	—
	Alcalinización.	—	+
	Reducción.	—	—

MUESTRA NUM. 13

SEGUNDA LECTURA. A LOS DIECIOCHO DÍAS

AGAR-GLUCOSADO		13 (1) Crecimiento blanco ocre abundante	13 (2) Crecimiento blanco fluorescente
Salicina.	Fermentación.	A	—
	Gas.	—	—
	Crecimiento.	+	+
Xilosa.	Fermentación.	A	A
	Gas.	+	—
	Crecimiento.	+	+
Sacarosa.	Fermentación.	A	A
	Gas.	+	—
	Crecimiento.	+	+
Galactosa.	Fermentación.	A	A
	Gas.	+	—
	Crecimiento.	+	+
Glucosa.	Fermentación.	A	A
	Gas.	+	—
	Crecimiento.	+	+
Lactosa.	Fermentación.	A	—
	Gas.	—	—
	Crecimiento.	+	+
Maltosa.	Fermentación.	A	—
	Gas.	+	—
	Crecimiento.	+	+
Glicerina.	Fermentación.	A	A
	Gas.	—	—
	Crecimiento.	+	+
Gelatina.	Licuefacción.	+	—
	Crecimiento.	—	—
Leche tornasolada.	Acidificación.	+	—
	Alcalinización.	—	+
	Reducción.	—	+

MUESTRA NUM. 14

PRIMERA LECTURA. A LOS SIETE DÍAS DE INOCULADOS Y EN ESTUFA A 24° C.

AGAR-GLUCOSADO		14 (1) Crec. blanco crema viscoso	14 (2) Crecimiento amarillo oro	14 (3) Crecimiento blanco escaso	14 (4) Crecimiento blanco fluores.
Salicina.	Fermenta.	A	A	A	—
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	—	+	+	+
Xilosa.	Fermenta.	A	A	—	A
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	—	—	+
Sacarosa.	Fermenta.	A	A	A	A
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	—	—	—	+
Galactosa.	Fermenta.	A	A	—	A
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	+	+	+
Glucosa.	Fermenta.	—	A	A	A
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	+	—	+
Lactosa.	Fermenta.	—	A	—	—
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	—	—	—
Maltosa.	Fermenta.	A	A	—	—
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	+	+	—
Glicerina.	Fermenta.	—	A	A	A
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	—	+	—	+
Gelatina.	Licuefac.	+	—	—	—
	Crecimien.	—	—	+	—
Leche tornsolada.	Acidificac.	+	—	—	—
	Alcaliniza.	—	—	—	—
	Reducción.	—	—	—	—

MUESTRA NUM. 14

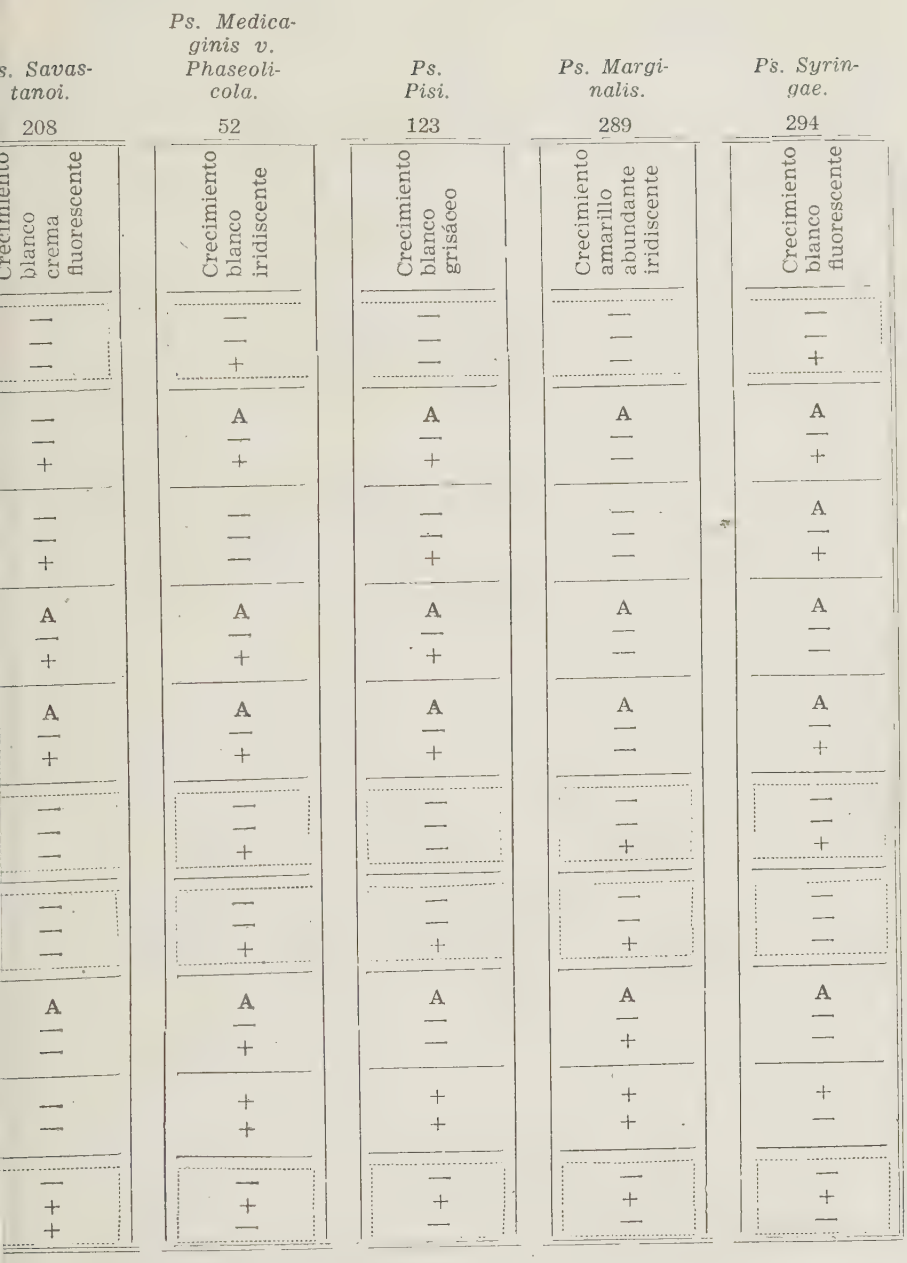
SEGUNDA LECTURA. A LOS DIECIOCHO DÍAS

AGAR-GLUCOSADO		14 (1) Crec. blanco crema viscoso	14 (2) Crecimiento amarillo oro	14 (3) Crecimiento escaso blanco	14 (4) Crecimiento blanco fluores.
Salicina.	Fermenta.	A	A	A	—
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	+	+	+
Xilosa.	Fermenta.	A	A	A	A
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	+	+	+
Sacarosa.	Fermenta.	A	A	A	A
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	—	+	+	+
Galactosa.	Fermenta.	A	A	A	A
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	+	+	+
Glucosa.	Fermenta.	A	A	A	A
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	+	+	+
Lactosa.	Fermenta.	A	A	A	—
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	—	—	+
Maltosa.	Fermenta.	A	A	A	—
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	+	+	+	+
Glicerina.	Fermenta.	A	A	A	A
	Gas.	—	—	—	—
	Crecimien.	—	+	+	+
Gelatina.	Licuefac.	+	—	—	—
	Crecimien.	+	—	+	—
Leche torn solada.	Acidificac.	+	+	+	—
	Alcaliniza.	—	—	—	+
	Reducción.	—	—	—	+

AGAR-GLUCOSADO		*Ps. Savastanoi.* 64	*Ps. Savastanoi.* 206	*Ps. Savastanoi.* 207
		Crecimiento blanco crema fluorescente	Crecimiento blanco abundante fluorescente	Crecimiento blanco abundante
Salicina...	Fermentación.	—	—	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	—	+
Xilosa	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	—	+	—
Sacarosa... ..	Fermentación.	—	—	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	—	+	—
Galactosa. ..	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Glucosa... ..	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Lactosa ...	Fermentación.	—	—	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	—
Maltosa...	Fermentación.	—	—	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	—	+	+
Glicerina.. ..	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Gelatina... ..	Licuefacción.	—	—	—
	Crecimiento.	—	—	—
Leche tornasolada ...	Acidificación.	—	—	—
	Alcalinización.	+	+	+
	Reducción.	—	+	+

ÉCTURA

DOS E INCUBADOS A 24° C.



AGAR-GLUCOSADO		*Ps. Savastanoi.* 64 Crecimiento blanco crema fluorescente	*Ps. Savastanoi.* 206 Crecimiento blanco fluorescente	*Ps. Savastanoi.* 207 Crecimiento blanco abundante
Salicina...	Fermentación.	—	—	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Xilosa	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Sacarosa... ..	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Galactosa. ..	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Glucosa... ..	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	—	+
Lactosa ...	Fermentación.	—	—	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Maltosa...	Fermentación.	—	—	—
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Glicerina.. ..	Fermentación.	A	A	A
	Gas.	—	—	—
	Crecimiento.	+	+	+
Gelatina... ..	Licuefacción.	—	—	—
	Crecimiento.	—	—	—
Leche tornasolada ..	Acidificación.	—	—	—
	Alcalinización.	+	+	+
	Reducción.	—	—	—

LECTURA

CULADOS E INCUBADOS A 24º C.

Ps. Savastanoi. 208	*Ps. Medicaginis v. Phaseolicola.* 52	*Ps. Pisi.* 123	*Ps. Marginalis.* 289	*Ps. Syringae.* 294
Crecimiento blanco crema abundante	Crecimiento blanco con iridiscencia	Crecimiento blanco grisáceo	Crecimiento amarillo verdoso iridiscente	Crecimiento blanco fluorescente
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	+	—	+	+
A	A	A	A	A
—	—	—	—	—
+	+	+	—	+
A	A	A	—	A
—	—	—	—	—
+	+	+	—	+
A	A	A	A	A
—	—	—	—	—
+	+	+	+	—
A	A	A	A	A
—	—	—	—	—
+	+	+	—	+
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	+	—	+	+
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
+	+	+	+	+
A	A	A	A	A
—	—	—	—	—
+	—	+	+	+
—	+	+	+	+
—	+	+	+	+
—	—	—	—	—
+	+	+	+	+
—	—	—	—	—

Significado de las abreviaturas.

En azúcares ... ...
- Fermentación ... ... { A = producción ácido. / — = no producción ácido
- Gas ... ... { + = producción gas. / — = no producción gas.
- Crecimiento... ... ... { + = hay crecimiento. / — = no hay crecimiento

Leche tornasolada. ...
- Acidificación. ... ... { + = resultado positivo.
- Alcalinización ... ... { + = resultado positivo.
- Reducción ... . { — = resultado negativo

En gelatina.. ... ... { + = hay licuefacción. / — = no hay licuefacción.

En almidón ... ... { + = hidrólisis. / — = no hidrólisis.

En $S\ H_2$ ... ... { + = producción $S\ H_2$. / — = no producción $S\ H_2$.

En $N\ H_3$ ... ... { + = producción de $N\ H_3$. / — = no producción de $N\ H_3$

En $N\ O_2$ ... ... { + = presencia de nitratos. / — = no presencia de nitratos.

Leche tornasolada.

La leche tornasolada sirve para formarnos una idea de la actividad bioquímica de la bacteria que se estudia.

Como es sabido, la actividad de las bacterias en este medio depende de su composición.

Contiene cinco sustancias principales, que son: dos azúcares, dos

proteínas y el tornasol. Los azúcares son: lactosa y una pequeña cantidad de glucosa que está presente como resultado de la hidrólisis de la lactosa durante la esterilización.

Las proteínas son: lactoalbúmina, presente en pequeña cantidad, y caseinógeno, la principal proteína de la leche.

Los cambios que se pueden producir en la leche como consecuencia de la actuación de las bacterias son: acidez, alcalinidad, coagulación, peptonización y reducción, interesándonos para nuestro trabajo solamente la alcalinidad, la reducción y, raras veces, la peptonización.

La alcalinidad se manifiesta exteriormente en el medio por un cambio del color malva, típico de la leche tornasolada a un color azul más o menos fuerte.

El origen de la alcalinidad se debe siempre a formación de sustancias básicas, las cuales las pueden producir bacterias de diferente comportamiento bioquímico. En general, atacan solamente la lactoalbúmina para producir amoníaco o aminas básicas, produciéndose entonces el típico color azul de la leche tornasolada alcalina.

La bacteria puede actuar sobre el caseinógeno de dos maneras: produciendo coagulación o peptonización, pudiéndonos interesar esta última, ya que se puede producir en medio alcalino. Este cambio se reconoce fácilmente porque cuando la leche está peptonizada se aclara.

El indicador tornasol puede ser reducido, y así no actuar solamente como indicador de pH, sino también como de óxido-reducción.

En estado de oxidación, su color es el rojo, malva o azul, de acuerdo con el pH del medio; si el tornasol está reducido la leche se queda incolora.

La reducción del tornasol se presenta primeramente en el fondo del tubo, y el producto suele ascender por él.

En resumen, los datos más importantes que debemos tener en cuenta al observar en nuestras experiencias la leche tornasolada es ver si el color es malva, azul, blanco o si se ha producido aclaramiento del medio

Para nuestra experiencia la leche tornasolada se preparó según la técnica corriente.

Hemos hecho un estudio detallado durante quince días de las variaciones del pH que producen en ella las diferentes estirpes de *Pseudomonas* y otras dos bacterias alcalinizantes (*Proteus vulgaris* y *Bacillus*

subtilis), que no pertenecen al grupo de bacterias fitopatógenas, y se han trazado las curvas correspondientes.

Se ha experimentado con *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis* solamente para observar las variaciones de pH que producían en leche tornasolada otras bacterias alcalinizantes que no fueran *Pseudomonas*.

En la experiencia se prepararon 18 lotes de matraces, tantos como número de estirpes bacterianas utilizamos en la prueba, formado cada uno de ellos por 14 matraces, número de días que se midieron las variaciones de pH por medio del potenciómetro.

En los matraces de 100 c. c., conteniendo cada uno de ellos 20 c. c. de leche tornasolada, se sembró con la misma cantidad de inóculo en cada uno y se incubaron a 24° C. todo el tiempo que duró la experiencia.

Como ya hemos indicado, se ha medido diariamente el pH de la leche tornasolada y se han obtenido los datos que consignamos a continuación, acompañados de las gráficas con las curvas representativas de la variación del pH.

RESULTADO DE LA VARIACION DE pH EN LECHE

Días	Testigo	*Pseudomonas savastanoi* 1 (2)	*Pseudomonas savastanoi* 2 (2)	*Pseudomonas savastanoi* 2 (4)	*Pseudomonas savastanoi* 12 (3)	*Pseudomonas savastanoi* 12 (14)	*Pseudomonas savastanoi* 13 (2)	*Pseudomonas savastanoi* 14 (4)	*Pseudomonas savastanoi* 64
2.º	6,5	7,4	7	7,2	7,1	7	7,1	7	7,1
3.º	6,6	7,9	7,3	7,8	8,1	7,5	7,4	7,5	7,7
4.º	6,5	7,9	7,7	7,9	8,1	7,8	7,4	7,7	7,9
5.º	6,5	8,5	8	8,7	8,7	8,5	8,1	8,2	8,5
6.º	6,5	8,6	8,3	8,5	8,7	8,5	8,4	8,3	8,5
7.º	6,5	8,6	8,3	8,6	8,5	8,5	8,4	8,4	8,5
8.º	6,5	8,6	8,4	8,6	8,6	8,6	8,5	8,6	8,5
9.º	6,5	8,6	8,4	8,6	8,6	8,6	8,5	8,6	8,5
10.º	6,5	8,7	8,4	8,6	8,7	8,7	8,5	8,6	8,6
11.º	6,5	8,8	8,5	8,6	8,8	8,8	8,5	8,7	8,6
12.º	6,5	8,8	8,5	8,8	8,8	8,7	8,5	8,9	8,7
13.º	6,5	8,6	8,5	8,6	8,6	8,7	8,5	8,8	8,6
14.º	6,5	8,7	8,5	8,8	8,7	8,7	8,5	8,7	8,6
15.º	6,5	8,7	8,5	8,7	8,7	8,7	8,5	8,8	8,7

TORNASOLADA POR DIFERENTES *PSEUDOMONAS*

Pseudomonas savastanoi 206	*Pseudomonas savastanoi* 207	*Pseudomonas savastanoi* 208	*Pseudomonas pisi* 123	*Pseudomonas marginalis* 289	*Pseudomonas syringae* 294	*Pseudomonas medicaginis var phaseolicola* 52	*Proteus vulgaris*	*Bacillus subtilis*
7,6	7,5	7,4	7,7	7,4	7,5	7,7	7,3	7
7,8	7,7	7,6	7,8	7,6	7,7	7,6	7,4	7
8,1	8,1	8	8	7,8	7,8	7,9	7,6	7,4
8,1	8,1	8,1	8,1	7,8	7,8	8,5	7,8	7,8
8,3	8,3	8,3	8,3	8,1	8	8,5	8	8,2
8,4	8,4	8,4	8,3	8,1	8,1	8,5	8,2	8,3
8,4	8,4	8,4	8,4	8,2	8,1	8,5	8,2	8,3
8,5	8,5	8,5	8,4	8,2	8,2	8,5	8,2	8,7
8,5	8,5	8,5	8,4	8,2	8,2	8,5	8,4	8,7
8,5	8,5	8,5	8,4	8,2	8,3	8,5	8,5	8,8
8,5	8,5	8,5	8,4	8,2	8,3	8,5	8,5	8,8
8,5	8,5	8,5	8,4	8,2	8,3	8,5	8,6	8,9
8,5	8,5	8,6	8,4	8,2	8,3	8,5	8,6	8,9
8,5	8,5	8,6	8,4	8,3	8,3	8,3	8,9	9

REPRESENTACION GRAFICA DE LAS VARIACIONES DEL pH PRODUCIDAS EN LECHE TORNASOLADA POR LOS DIFERENTES *PSEUDOMONAS* ENSAYADOS

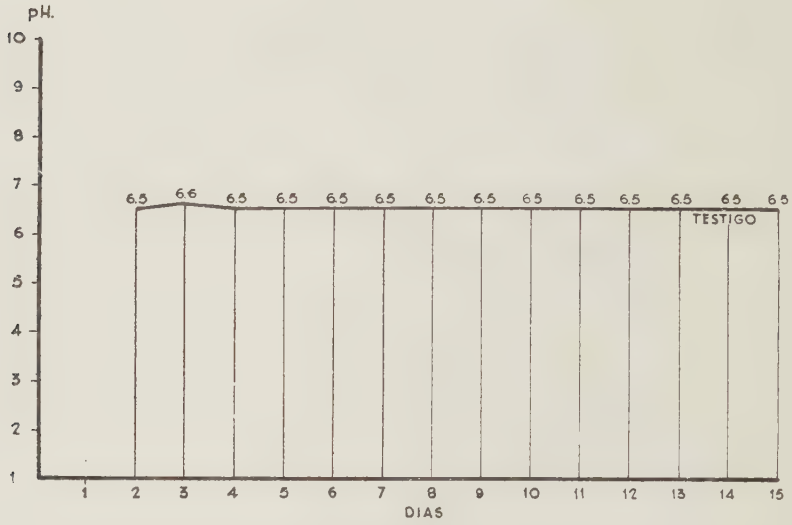


FIG. 1.
Testigo. Leche tornasolada.

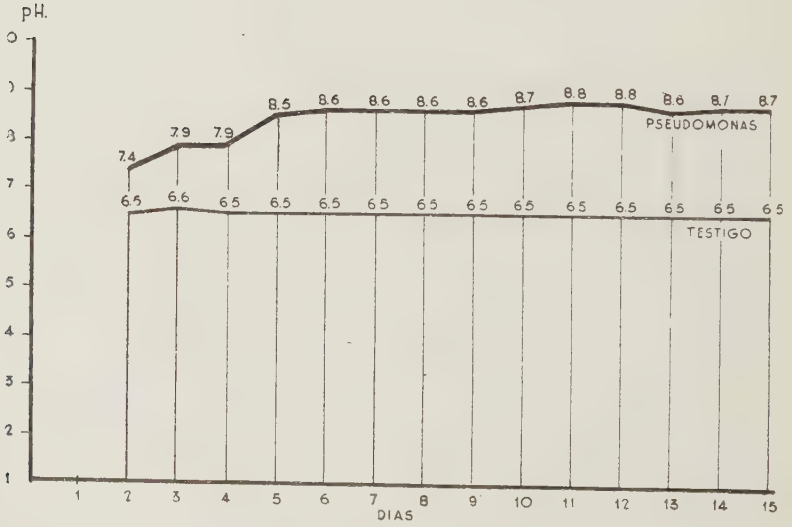


FIG. 2.
Pseudomonas savastanoi 1 (2).

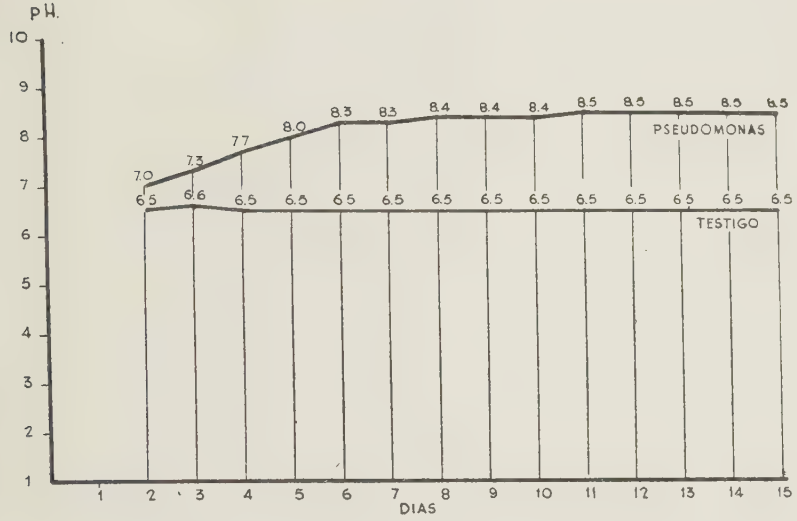


FIG. 3.
Pseudomonas savastanoi 2 (2).

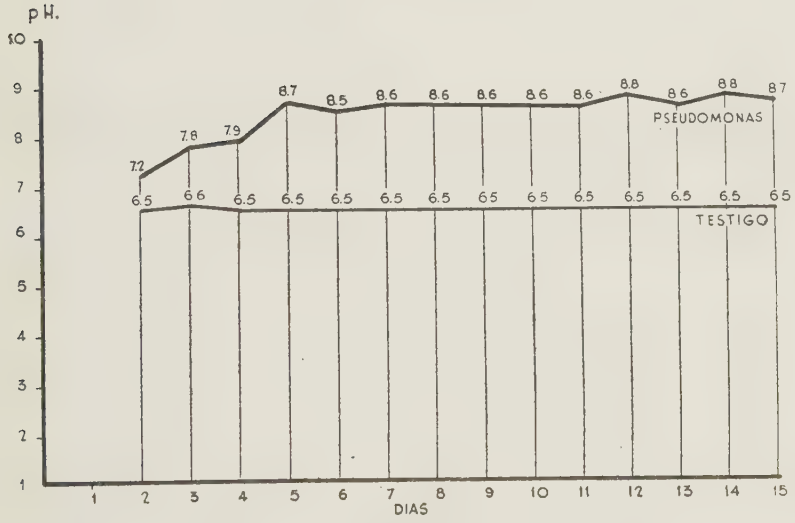


FIG. 4.
Pseudomonas savastanoi 2 (4).

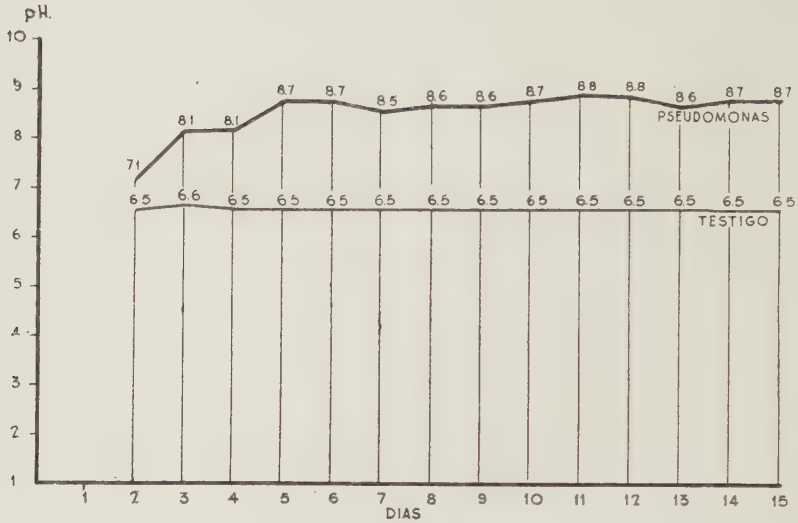


FIG. 5.
Pseudomonas savastanoi 12 (3).

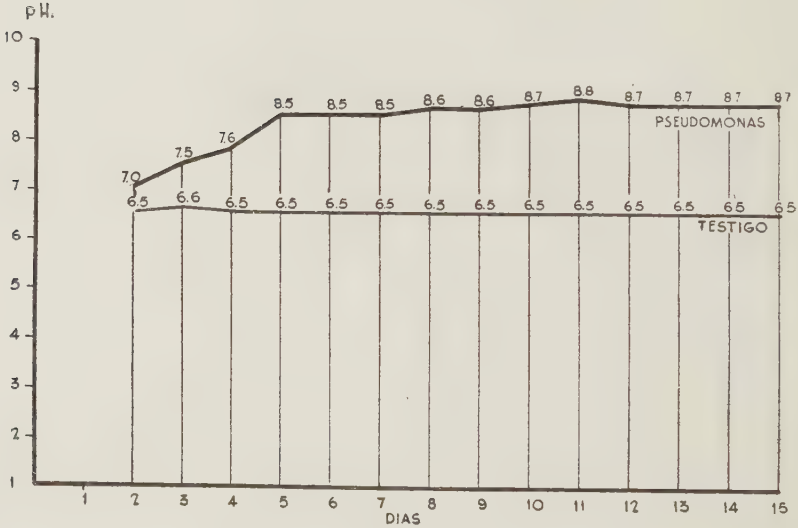


FIG. 6.
Pseudomonas savastanoi 12 (14).

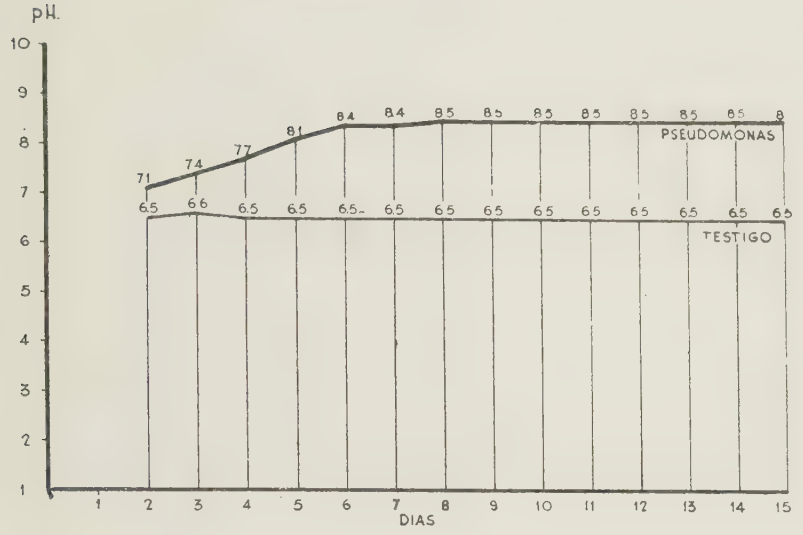


FIG. 7.
Pseudomonas savastanoi 13 (2).

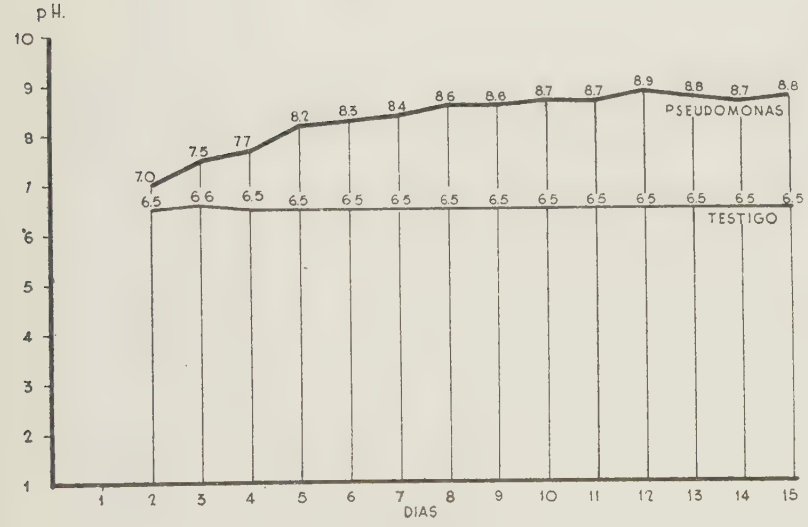


FIG. 8.
Pseudomonos savastanoi 14 (4).

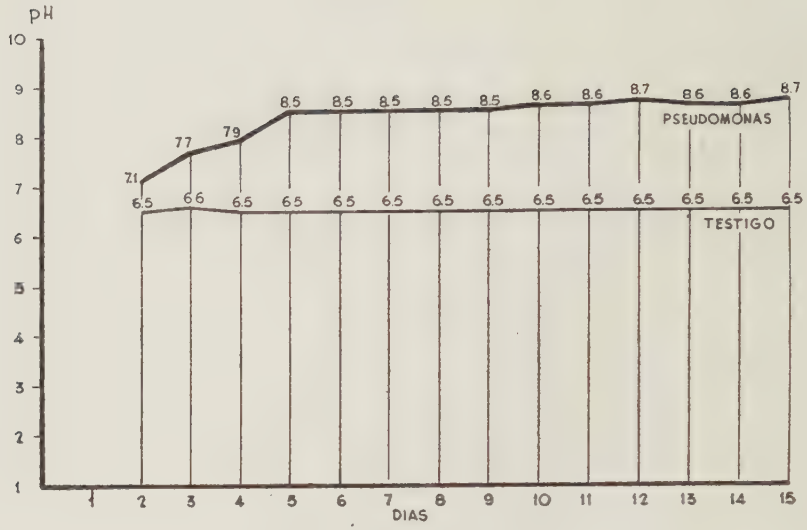


FIG. 9.
Pseudomonas savastanoi 64.

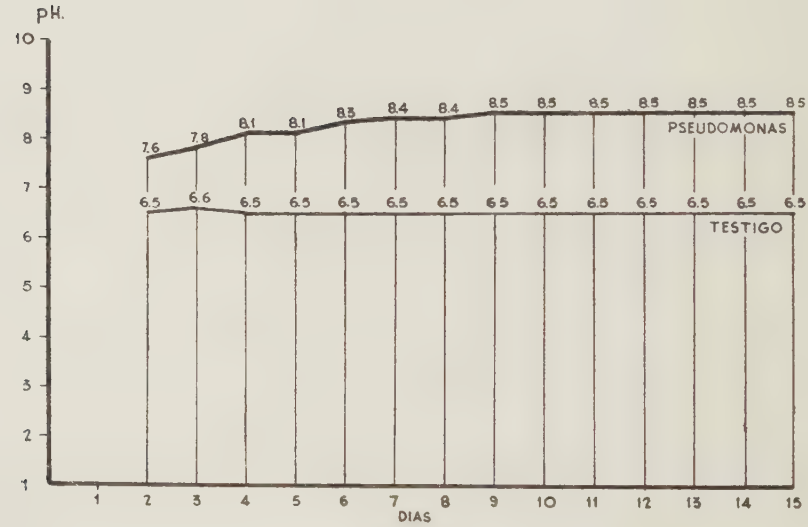


FIG. 10.
Pseudomonas savastanoi 206.

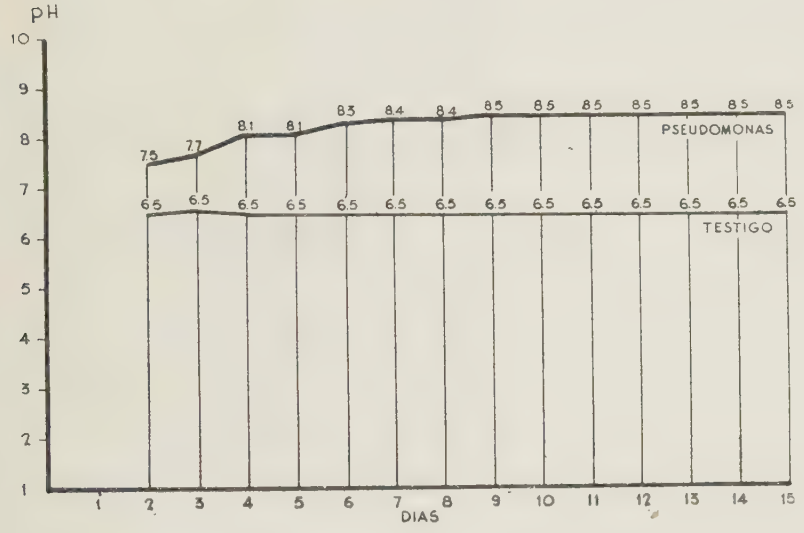


FIG. 11.
Pseudomonas savastanoi 207.

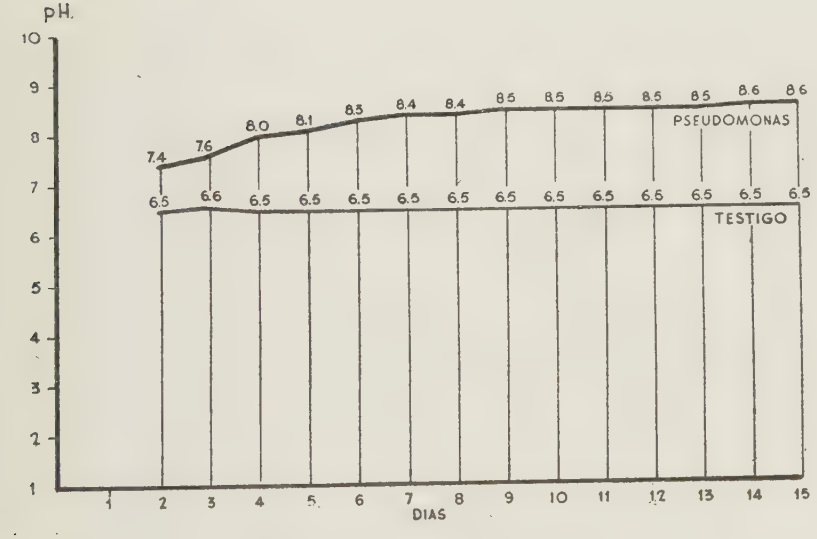


FIG. 12.
Pseudomonas savastanoi 208.

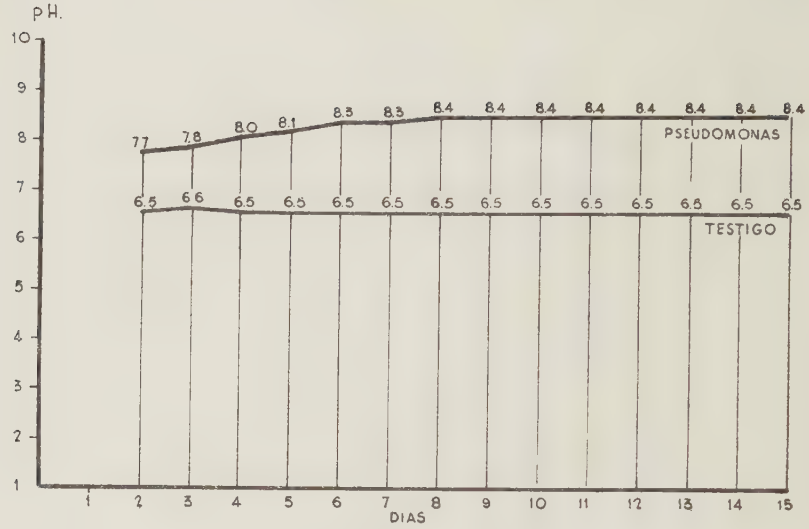


FIG. 13.
Pseudomonas pisi 123.

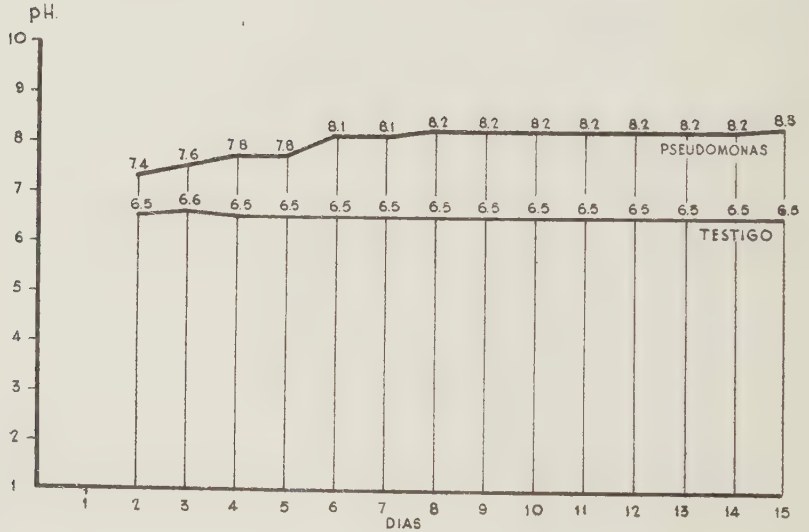


FIG. 14.
Pseudomonas marginalis 289.

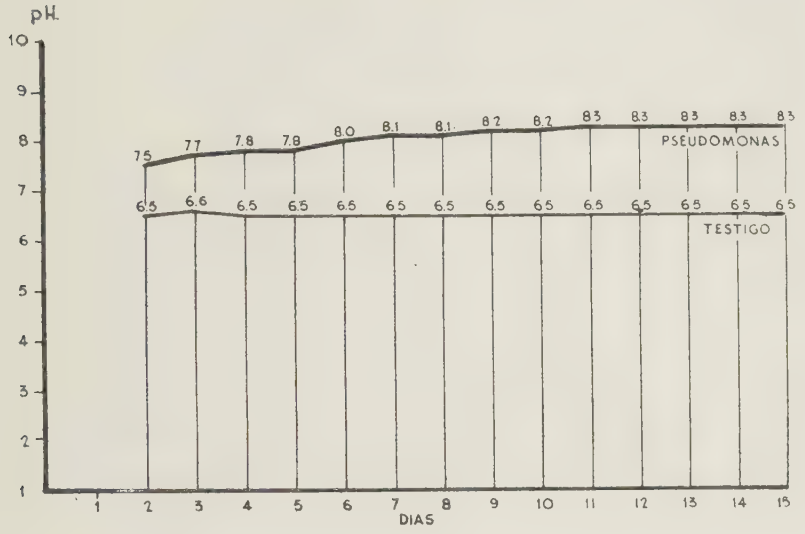


FIG. 15.
Pseudomonos syringae 294.

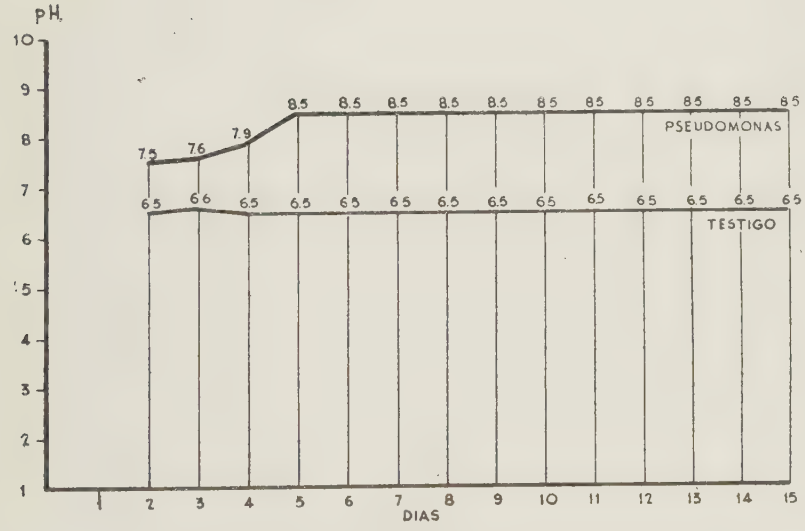


FIG. 16.
Pseudomonas medicaginis var: *phaseolicola* 52.

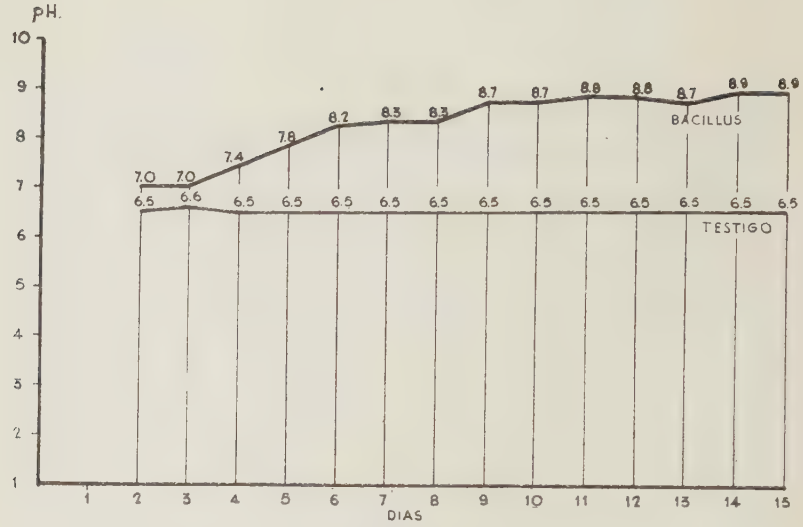


FIG. 17.
Bacillus subtilis.

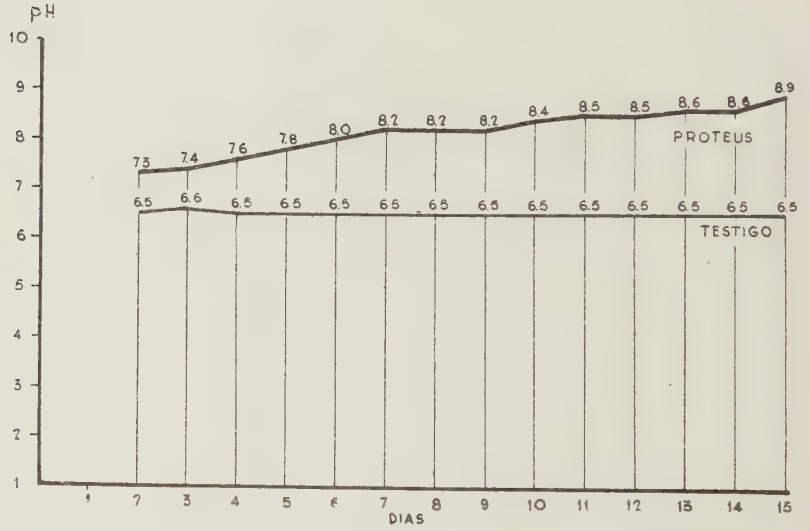


FIG. 18.
Proteus vulgaris.

Las conclusiones que se sacaron de estas medidas y de la observación de las curvas trazadas indican que:

1.° Los *Pseudomonas* estudiados producen una elevación relativamente rápida de la alcalinidad, que alcanza su máximo entre el quinto y sexto día de incubación a 24° C. La mayoría de las estirpes estudiadas lo alcanzan en el quinto día.

El pH de la leche tornasolado testigo estéril se mantiene constante durante los quince días de la experiencia.

2.° Al alcanzar el pH (8 — 8,5) que podríamos llamar máximo, la alcalinidad se mantiene casi constante, pues si hay variaciones son casi inapreciables.

3.° El *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis* producen la elevación de la alcalinidad de una manera progresiva, no observándose en la curva representativa de dicha variación ningún punto máximo.

Parece ser que la alcalinidad continuó aumentando después de los quince días que duró esta experiencia.

Medio ortocresol-lactosa.

Este medio selectivo se hizo en un principio partiendo de leche y de dos indicadores que entre varios se eligieron como más convenientes; uno de ellos no nos ha dado después de la experiencia resultados satisfactorios.

Estos indicadores han sido azul de timol y ortocresolftaleína. Los virajes de dichos indicadores son:

Azul de timol (viraje alcalino)	pH = 8 — 9,6
Azul de timol (viraje ácido)...	pH = 1,2 — 2,8
Ortocresolftaleína	pH = 8,2 — 9,8

Dando el azul de timol en medio alcalino color azul y el ortocresolftaleína color rojo.

Con el indicador azul de timol se han hecho diversas experiencias, que nos han puesto de manifiesto las causas por las que dicho indicador no es útil para la preparación del medio.

Con el indicador ortocresolftaleína se empezó haciendo una solución al 5 por 100 en sosa normal, se agregó a la leche hasta elevar su pH a 7,5, quedando, como es lógico, incolora. Su viraje en medio alcalino era el color rojo deseado; pero vimos que, al esterilizar a vapor, el medio no se quedaba incoloro, sino que adquiría un tono anaranjado claro.

Al sembrar en él las estirpes de *Pseudomonas* el viraje se produjo a los ocho días de incubación a 24° C., siendo el color anaranjado fuerte al cabo de unos días más.

Con estos avances, vislumbramos el posible resultado satisfactorio del nuevo medio que se estudiaba y que poco después logramos preparar con buen éxito.

En principio se probó también la posible acción bactericida de los indicadores en el medio mediante su adición de cantidades variables, y vimos que el ortocresolftaleína en la proporción de 0,1 — 0,4 grs. de indicador por 1.000 c. c. de caldo no era bactericida, sino que parecía estimular más bien el crecimiento de las bacterias en el medio.

Se preparó otro medio similar al anterior, en el que el indicador se agregaba diluído al 2 por 100 en sosa normal, y los resultados fueron parecidos a los anteriores.

Como la preparación del medio ortocresol-lactosa, usando leche como base, presentaba muchos inconvenientes, se pensó en la sustitución de ésta por un caldo de carne.

Al caldo preparado por las técnicas usuales le agregamos lactosa, por no ser atacada por los *Pseudomonas*. Así se pone de manifiesto si la bacteria sembrada en el medio tiene un poder proteolítico fuerte o si el sacarolítico es más predominante. Las bacterias estudiadas tienen, con las proteínas del caldo, materia prima suficiente para producir aumento de su alcalinidad y, por tanto, el viraje, si usamos un indicador apropiado.

Primera experiencia.

Como medios de tanteo hasta lograr unos resultados apreciables, hemos preparado y ensayado los que van resumidos en el siguiente cuadro, variando la proporción de lactosa y el pH:

Caldo... ... ...
- Lactosa 1 % ... ... → pH = 7; pH = 7,4; pH = 7,8
- Lactosa 2 % ... ... → pH = 7; pH = 7,4; pH = 7,8
- Lactosa 4 % ... ... → pH = 7; pH = 7,4; pH = 7,8

El indicador está preparado al 2 por 100 en sosa normal.

La técnica seguida en la preparación del medio ha sido la siguiente: al caldo se le agregó el indicador en la proporción del 20 por 1.000 (0,4 grs. para 1.000 c. c. de caldo), y a partir de este caldo se han hecho tres lotes, los cuales se ajustaron a los pH indicados; el caldo así ajustado se dividió a su ver en otros tres lotes, a los que, como se ve por el cuadro anterior, le agregamos la lactosa en proporción variable.

Una vez envasado el medio en tubos fué esterilizado tres días a vapor durante veinte minutos.

Como no sabíamos si en este medio se producirían ligeros cambios de pH antes y después de la esterilización, se midieron éstos, obteniéndose los datos que se dan a continuación:

	Antes de esterilizar	Después de esterilizar
pH = 7.	1 % de lactosa...	pH = 7,3
	2 % » »	pH = 7,2
	4 % » »	pH = 7
pH = 7,4... ...	1 % de lactosa...	pH = 7,7
	2 % » »	pH = 7,6
	4 % » »	pH = 7,4
pH = 7,8... ...	1 % de lactosa...	pH = 8
	2 % » »	pH = 7,9
	4 % » »	pH = 7,8

Un dato curioso que se saca de la observación de estos resultados es que, cuando la lactosa va en la proporción del 4 por 100, no hay variación en el pH del medio, lo que no ocurre con la lactosa al 1 y 2 por 100.

En estos medios se han sembrado todas las estirpes de *Pseudomonas* con las que trabajamos e incubado a 24° C. A los siete días, y en algunos a los seis, se ha comenzado a ver un ligero cambio al color rojo, habiéndose apreciado desde el segundo o tercer día un buen crecimiento bacteriano en todos ellos.

No en todos los tubos sembrados el color rojo producido ha sido el mismo, y así se han observado dos tonos diferentes, uno rojo claro (que al aumentar la alcalinidad pasa a rojo sangre) y un rojo castaño (que también, con el aumento de alcalinidad, pasa a rojo fuerte).

El color rojo claro se produce en el medio que tiene el pH de 7 — 7,4 y 7,8, y en el que la lactosa va en menor proporción, 1 y 2 por 100, mientras que el tono rojo castaño se produce en los de pH 7 — 7,4 y 7,8 y lactosa al 4 por 100.

Los cambios de coloración y crecimiento bacteriano se han observado durante diez días. Los resultados que hemos obtenido con todas las estirpes ensayadas son muy semejantes y se pueden resumir en el siguiente cuadro, que corresponde a los resultados obtenidos con el *Pseudomonas savastanoi* 1 (2):

GRADOS DE CRECIMIENTO Y COLORACION OBTENIDOS EN UNA EXPERIENCIA CON EL MEDIO ORTOCRESOL-LACTOSA

Ps. savast. 1 (2)		1d.	2d.	3d.	4d.	5d.	6d.	7d.	8d.	9d.	10d.
pH=7	1 % lactosa.	—	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		—	—	—	—	—	—	+	+	++	++
	2 % lactosa.	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	+++
	4 % lactosa.	—	—	+	++	++	++	++	+++	+++	+++
		—	—	—	—	—	+	+	+	++	++
pH=7,4	1 % lactosa.	—	—	—	+	+	++	++	++	++	++
		—	—	—	—	—	+	+	++	++	++
	2 % lactosa.	—	+	++	++	++	++	++	++	++	++
		—	—	—	—	—	+	++	++	++	++
	4 % lactosa.	—	—	+	++	++	++	++	++	++	++
		—	—	—	—	—	—	+	+	++	++
pH=7,8	1 % lactosa.	—	—	—	+	++	++	++	+++	+++	+++
		—	—	—	—	—	—	+	+	++	++
	2 % lactosa.	—	—	+	+	++	++	++	++	++	++
		—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	+++
	4 % lactosa.	—	—	—	+	++	++	++	++	++	++
		—	—	—	—	+	+	+	+	+	+

En cada casilla el signo superior corresponde a grados de crecimiento y el inferior a la intensidad de coloración.

Por los resultados obtenidos se ha considerado como bueno, según se ha descrito anteriormente, el medio ortocresol-lactosa que tenga un pH de 7 y lactosa al 2 por 100, aunque resultados semejantes se han obtenido con los de pH 7 y 1 por 100 de lactosa y pH 7,4 y 1 y 2 por 100 de lactosa.

En general, se puede decir que este ensayo preliminar de tanteo no ha fallado en ninguna proporción de lactosa y pH empleados, aunque sí, como ya hemos indicado, se aprecian ligeras variaciones en los resultados.

Segunda experiencia.

Se ha hecho una segunda experiencia preparando el medio en las proporciones que tomamos como buenas (pH = 7; 2 por 100 de lactosa y 0,4 grs. de ortocresolftaleína por 1.000 c. c. de caldo), y se sembró en él de las distintas estirpes bacterianas que estudiamos.

Durante diez días se estudiaron las variaciones de pH del medio con un potenciómetro, y se han trazado las curvas correspondientes. Los resultados obtenidos los consignamos a continuación.

Trabajamos con 15 estirpes de *Pseudomonas* durante ocho días; se prepararon en total 120 matraces de 100 c. c., que contenían 20 c. c. del medio a ensayar, y se sembraron en él con la misma cantidad de inóculo.

VALORES DE pH EN LA SEGUNDA EXPERIENCIA CON ORTOCRESOL LACTOSA

ESTIRPES	2.º d.	3.º d.	4.º d.	5.º d.	6.º d.	7.º d.	8.º d.
Ps. savastanoi. 1 (2)	7,4	7.7	7,8	8,1	8.4	8,5	8,6
Ps. savastanoi. 2 (2)	7,2	7,4	7,5	7,9	8,1	8,1	8,3
Ps. savastanoi. 2 (4)	7,2	7,5	7,5	8,0	8,3	8,4	8,4
Ps. savastanoi. 12 (3)	7,3	7,4	7,8	8,2	8,5	8,6	8,5
Ps. savastanoi. 12 (14)	7,2	7,5	7,7	7,8	8,2	8,4	8,5
Ps. savastanoi. 13 (2)	7,3	7,6	7,8	7,9	7,9	8,2	8,3
Ps. savastanoi. 14 (4)	7,4	7,5	7,9	8,2	8,6	8,6	8,6
Ps. savastanoi. 64	7,4	7,6	7,7	8,0	8,4	8,5	8,5
Ps. savastanoi. 206	7,3	7,5	7,8	8,1	8,4	8,5	8,8
Ps. savastanoi. 207	7,2	7,3	7,5	7,8	7,9	8,1	8,2
Ps. savastanoi. 208	7,3	7,6	7,8	8,1	8,5	8,5	8,5
Ps. pisi. 123	7,2	7,4	7,5	7,9	8,2	8,3	8,5
Ps. marginalis. 289	7,4	7,5	7,8	7,9	8,3	8,4	8,5
Ps. syringae. 294	7,3	7,6	7,9	8,3	8,6	8,8	8,8
Testigo.	7,2	7,2	7,3	7,2	7,2	7,2	7,2

REPRESENTACION GRAFICA DE LAS VARIACIONES DEL pH EN ORTOCRESOL-LACTOSA POR DIVERSAS ESTIRPES DE *PSEUDOMONAS*

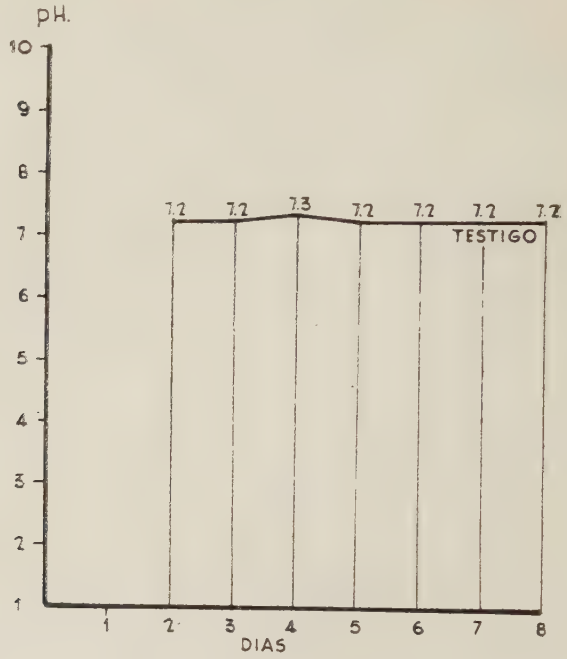


FIG. 19.
Testigo. Ortocresol-lactosa.

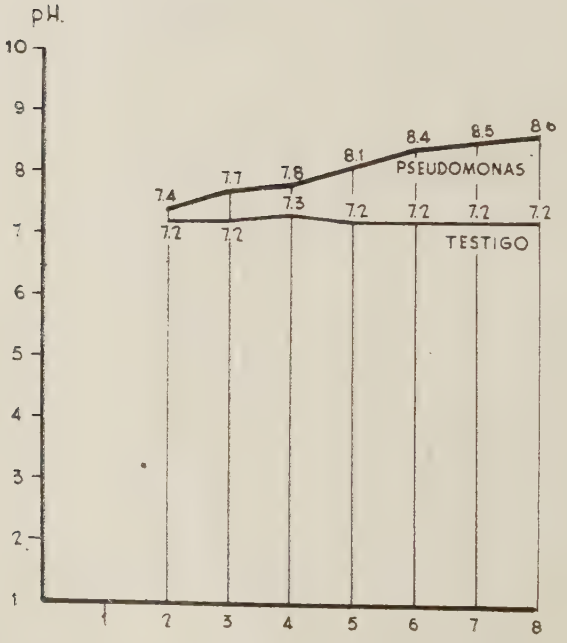


FIG. 20.
Pseudomonas savastanoi 1 (2).

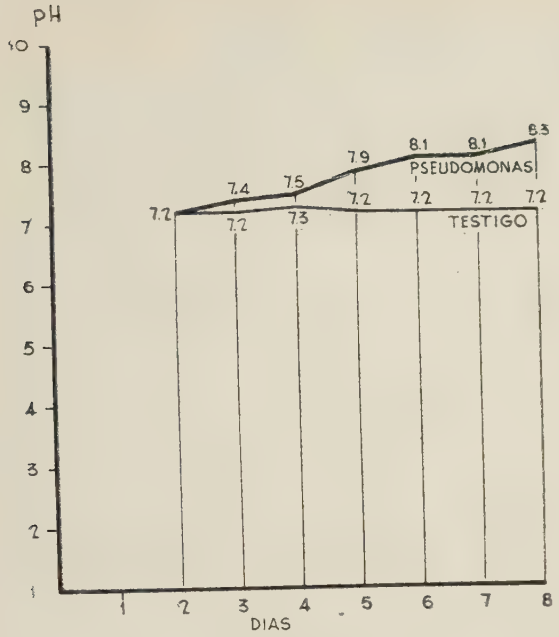


FIG. 21.
Pseudomonas savastanoi 2 (2).

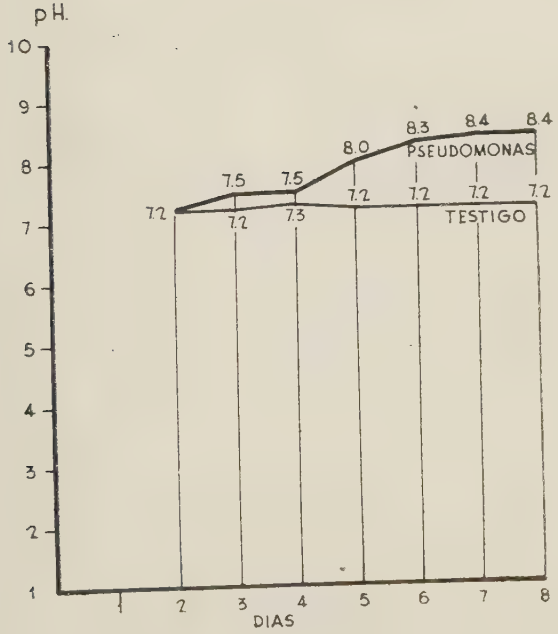


FIG. 22.
Pseudomonas savastanoi 2 (4).

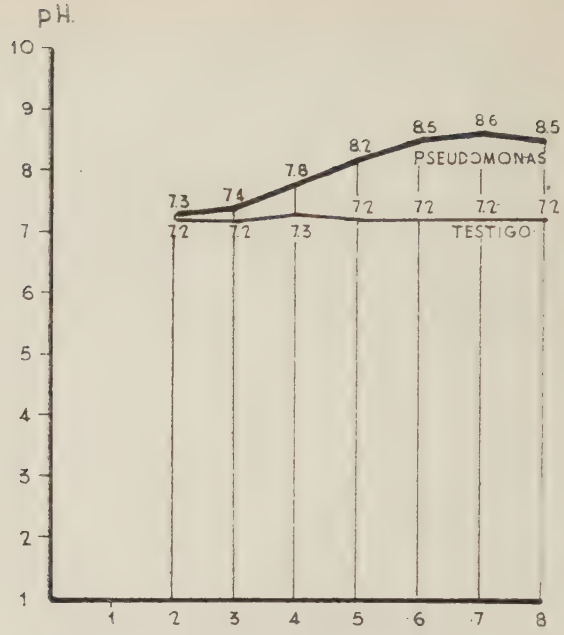


FIG. 23.
Pseudomonas savostanoi 12 (3).

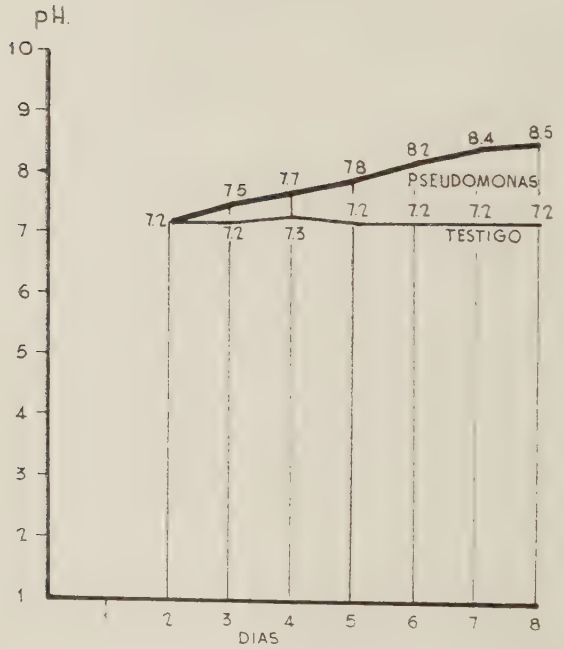


FIG. 24.
Pseudomonas savastanoi 12 (14).

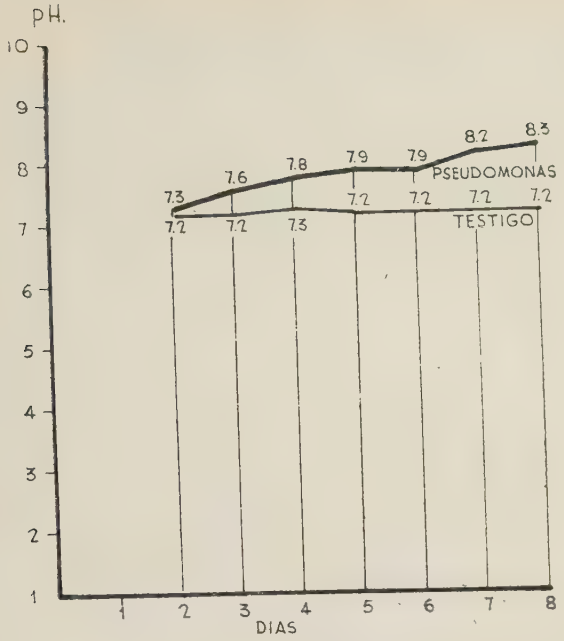


FIG. 25.

Pseudomonas savastanoi 13 (2).

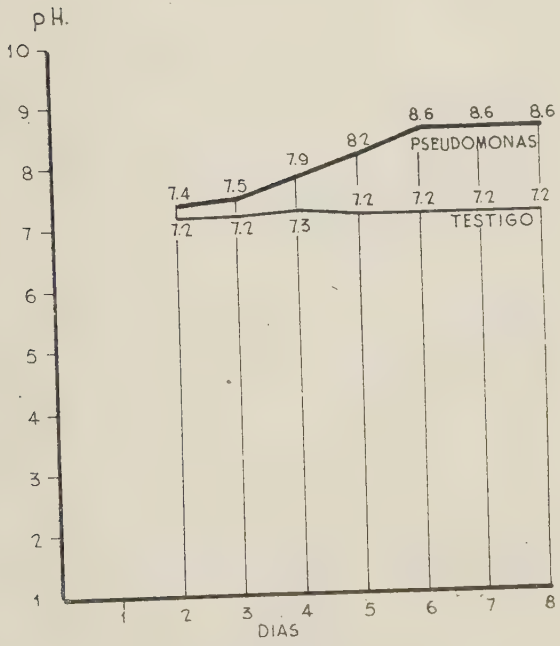


FIG. 26.

Pseudomonas savastanoi 14 (4).

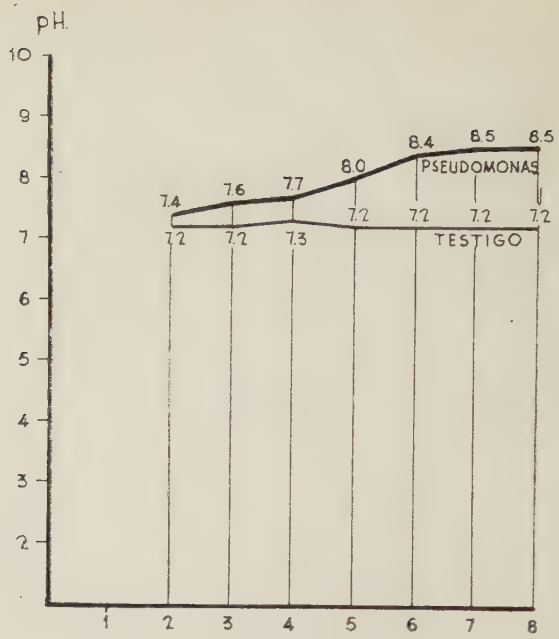


FIG. 27.

Pseudomonas savastanoi 64.

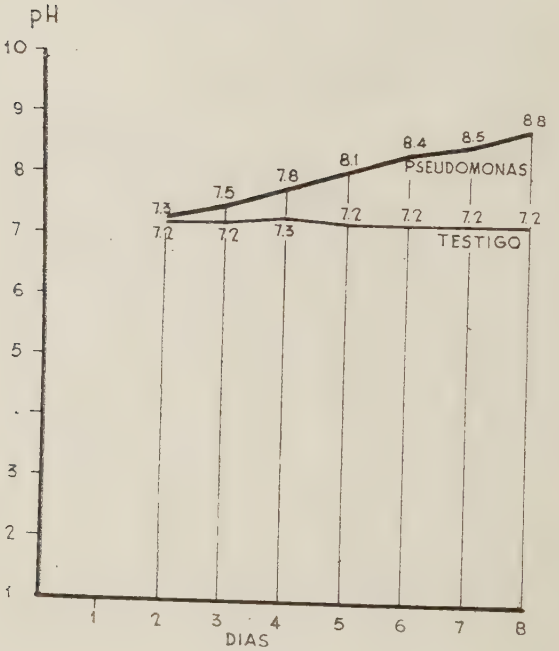


FIG. 28.

Pseudomonas savostanoi 206.

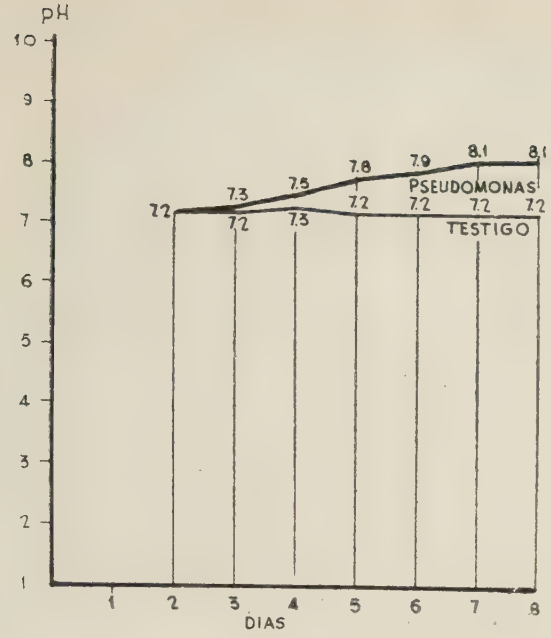


FIG. 29.
Pseudomonas savastanoi 207.

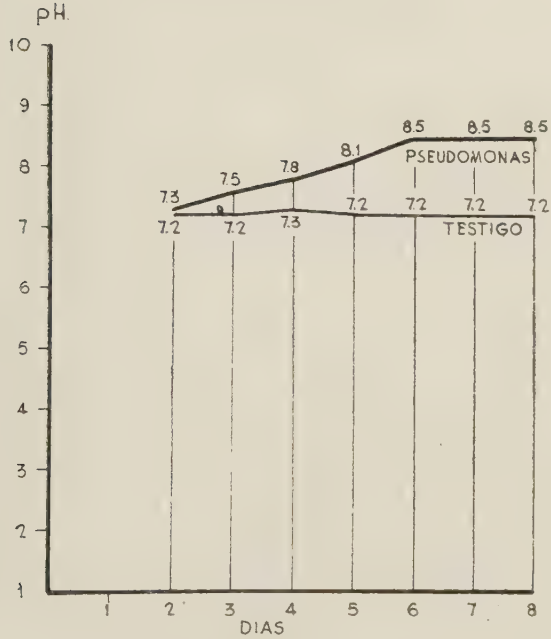


FIG. 30.
Pseudomonas savastanoi 208.

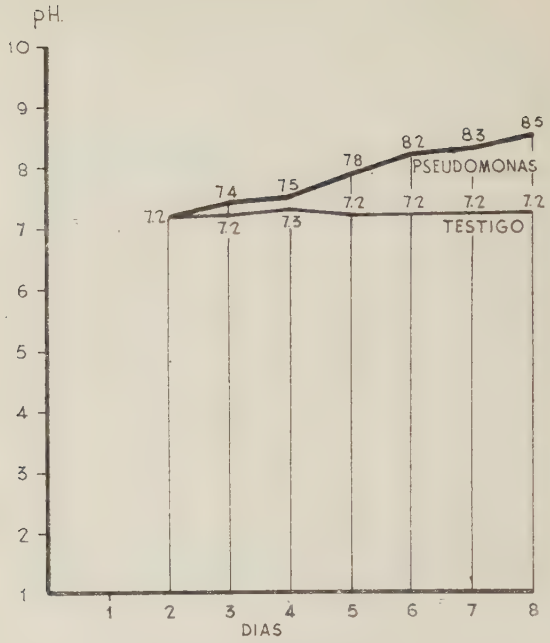


FIG. 31.
Pseudomonas pisi 123.

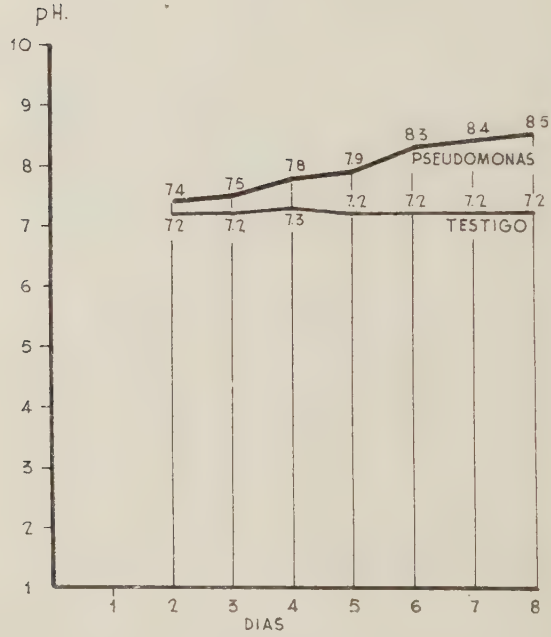


FIG. 32.
Pseudomonas marginalis 289.

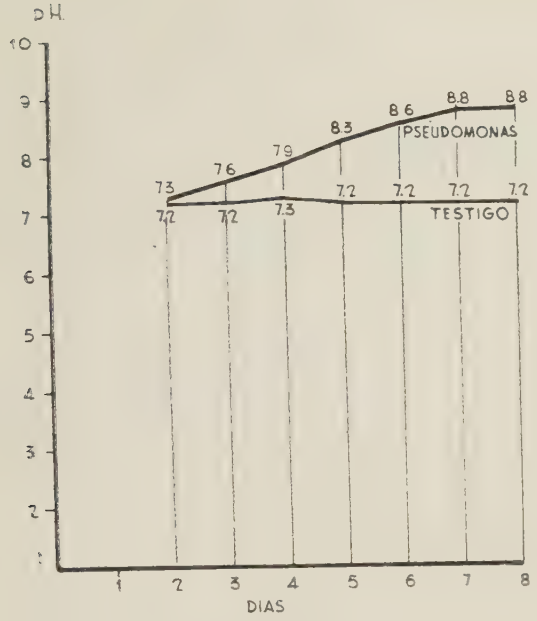


FIG. 33.
Pseudomonas syringae 294.

Según se puede observar por los datos obtenidos, el cambio al color rojo se produjo en el sexto o séptimo día de incubación a 24° C., ya que en esos días el medio alcanzó el pH necesario para producir el viraje del indicador ortocresolftaleína.

Tercera experiencia.

Otra tercera experiencia se ha realizado: variando la proporción del indicador ortocresolftaleína, manteniendo en el 2 por 100 la cantidad de lactosa y ajustando el pH del medio a 6,5, igual al de la leche tornasolada. La técnica seguida fué la siguiente: al caldo se le agregó el indicador en la proporción del 5 por 1.000 (el ortocresolftaleína está solubilizado en sosa normal en la proporción del 2 por 100). Se ha ajustado su pH

a 6,5 con Cl H 0,1 normal y Na OH 0,1 normal, y se ha esterilizado durante dos días a vapor fluente. La lactosa va también al 2 por 100.

En resumen, este medio lleva: por 1.000 c. c. de caldo, 2 por 100 de lactosa y 0,1 gr. de ortocresolftaleína, siendo el pH de 6,5.

La experiencia que se ha hecho con este medio ha consistido en estudiar su viraje y variación de pH durante quince días, trazándose las curvas correspondientes de las bacterias que estudiamos.

Con los *Pseudomonas* se han estudiado dos bacterias, que son también alcalinizantes en leche tornasolada, y que no pertenecen al grupo de bacterias fitopatógenas. Dichas bacterias son: *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis*.

Como para esta prueba trabajamos con 20 estirpes bacterianas y la experiencia duró quince días, se utilizaron 300 matraces de 100 c. c. de capacidad, que contenían cada uno de ellos 20 c. c. del medio ortocresol-lactosa, en total 6.000 c. c. del medio.

Los resultados obtenidos los damos a continuación.

VALORES DE pH OBTENIDOS EN LA TERCERA EXPERIENCIA CON EL MEDIO ORTOCRESOL-LACTOSA

ESTIRPES	2.º d.	4.º d.	6.º d.	8.º d.	10.º d.	12.º d.
Ps. savastanoi. 1 (2)	6,8	7,3	7,5	7,8	7,9	7,9
Ps. savastanoi. 2 (2)	6,8	7,3	7,5	7,7	7,9	8,0
Ps. savastanoi. 2 (4)	6,7	7,3	7,4	7,7	7,7	7,9
Ps. savastanoi. 12 (3)	6,9	7,3	7,6	7,9	8,2	8,1
Ps. savastanoi. 12 (14)	6,8	7,2	7,6	7,8	7,8	7,9
Ps. savastanoi. 13 (2)	6,8	7,4	7,7	7,8	7,8	7,9
Ps. savastanoi. 14 (4)	6,7	7,3	7,6	7,8	7,8	8,0
Ps. savastanoi. 64	6,8	7,4	7,9	7,9	8,2	8,2
Ps. savastanoi. 206	7,0	7,4	7,6	7,6	7,6	7,9
Ps. savastanoi. 207	6,8	7,4	7,9	8,1	8,2	8,1
Ps. savastanoi. 208	6,8	7,6	7,9	7,9	7,9	7,9
Ps. pisi. 123	6,7	7,1	7,3	8,0	8,1	8,2
Ps. maginalis. 289	7,0	7,3	7,9	8,1	8,0	8,2
Ps. syringae 294	7,0	7,9	8,0	8,3	8,5	8,5
Proteus vulgaris.	6,5	6,8	7,2	8,1	8,1	8,4
Bacillus subtilis.	7,1	7,9	7,9	8,4	8,4	8,6
Testigo.	6,5	6,5	6,5	6,6	6,5	6,5

REPRESENTACION GRAFICA DE LAS VARIACIONES DEL pH EN ORTOCRESOL-LACTOSA PRODUCIDAS POR DIVERSAS ESTIRPES DE *PSEUDOMONAS*

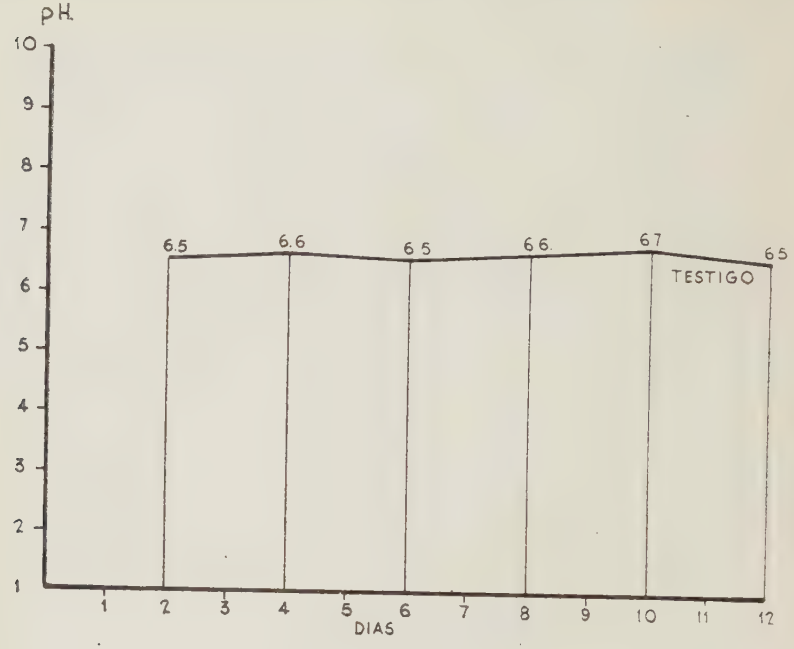


FIG. 34.
Testigo: ortocresol-lactosa.

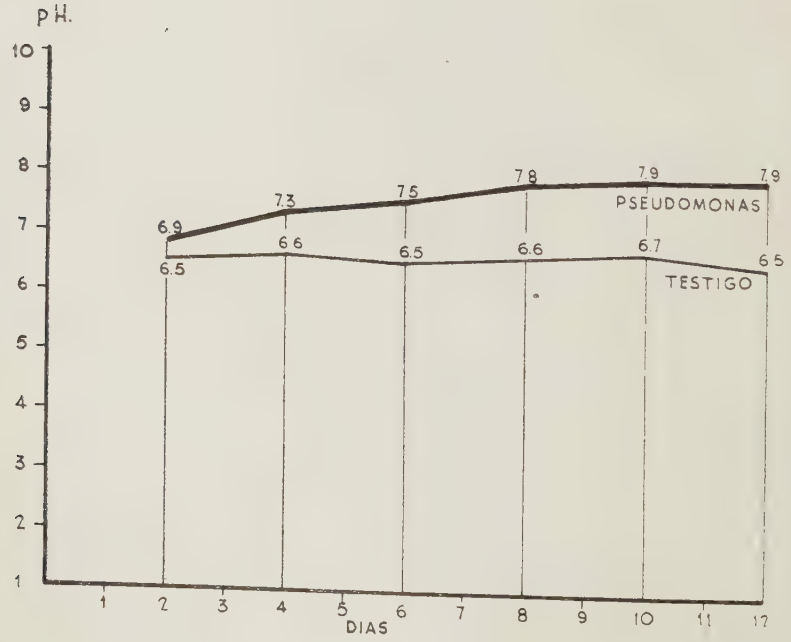


FIG. 35.
Pseudomonas savastanoi 1 (2).

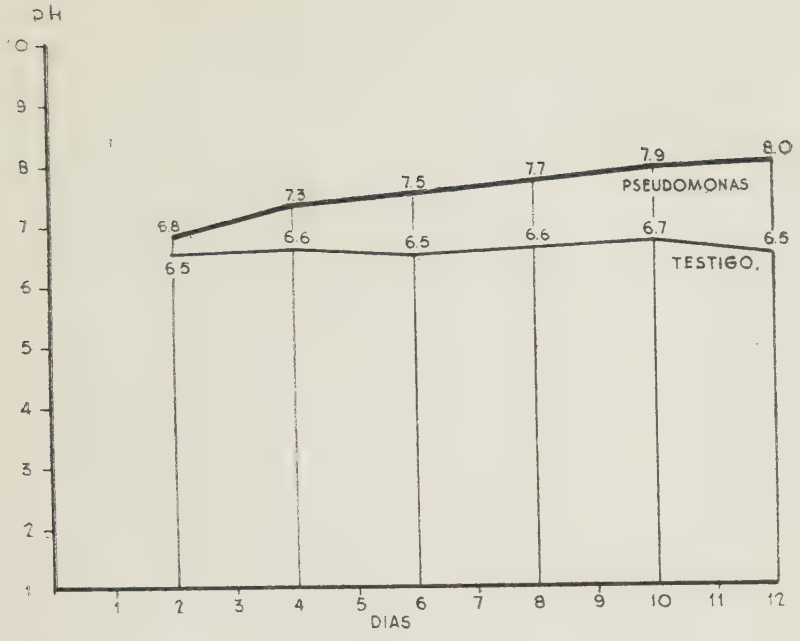


FIG. 36

Pseudomonas savastanoi 2 (2).

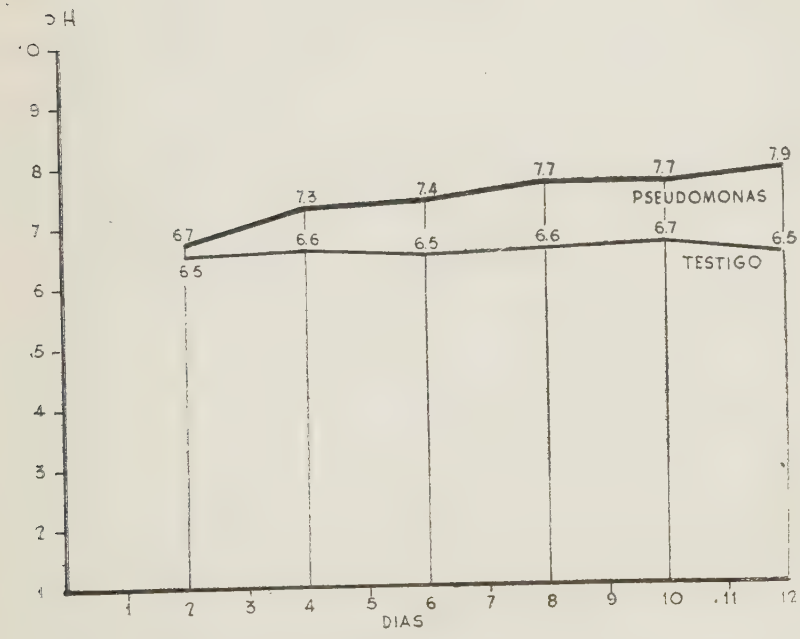


FIG. 37.

Pseudomonas savastanoi 2 (4).

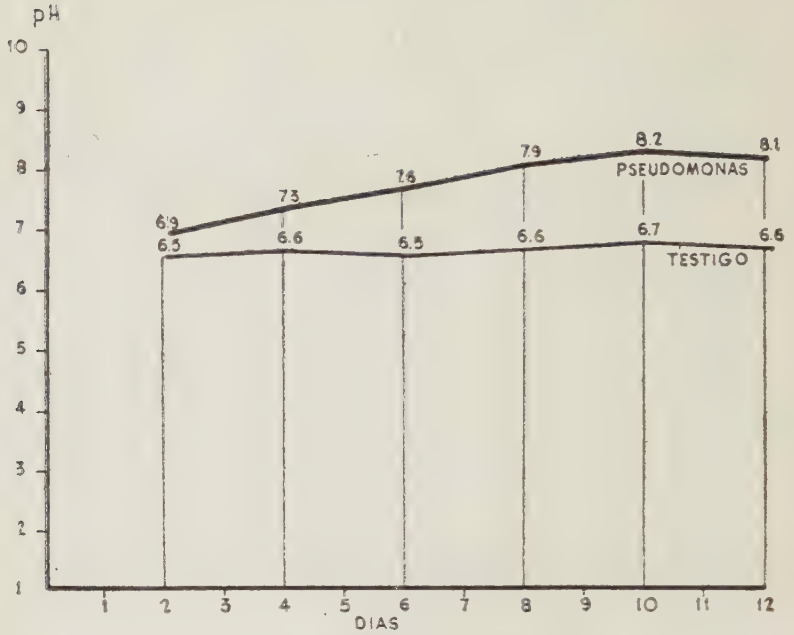


FIG. 38.
Pseudomonas savastanoi 12 (3).

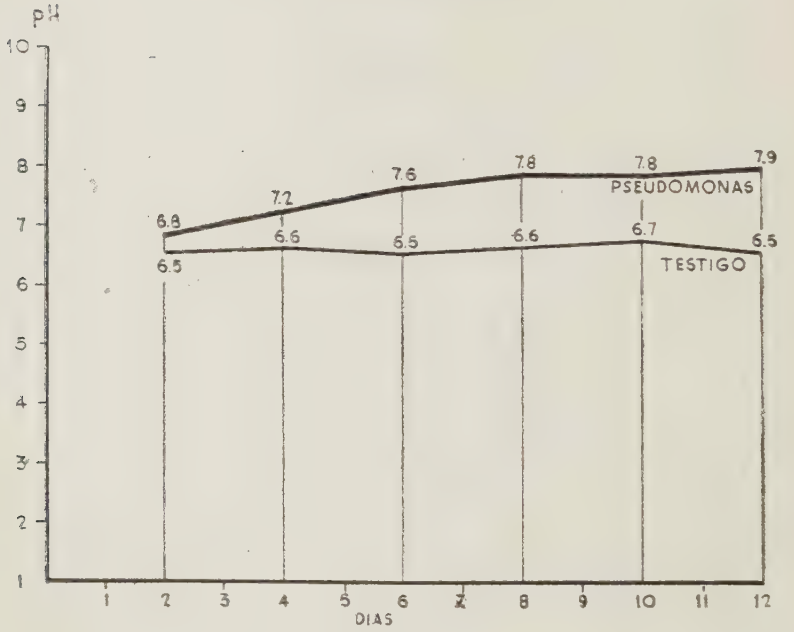


FIG. 39.
Pseudomonas savastanoi 12 (14)

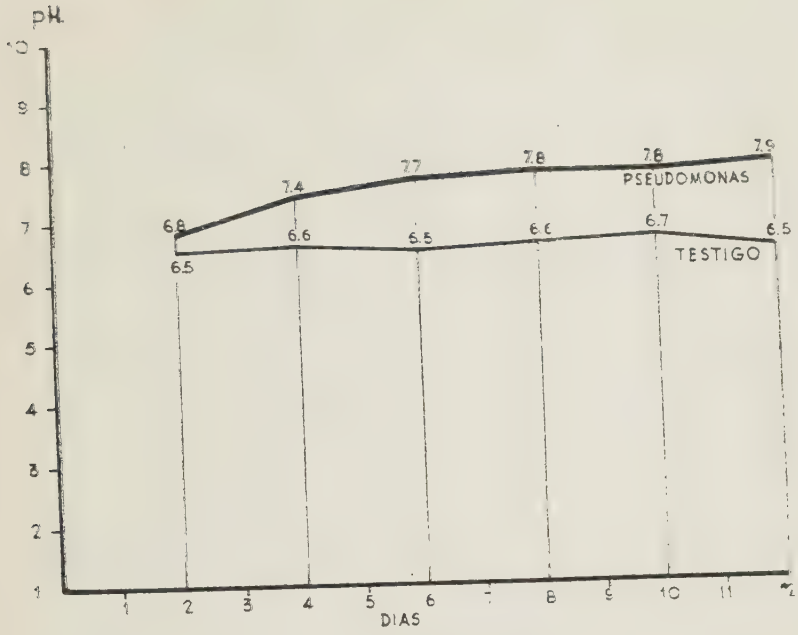


FIG. 40.
Pseudomonas savastanoi 13 (2).

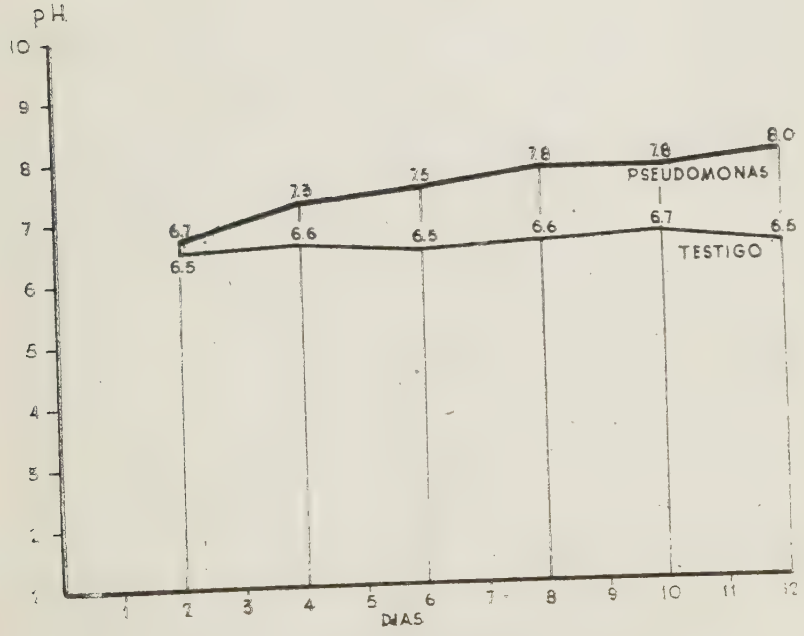


FIG. 41.
Pseudomonas savastanoi 14 (4).

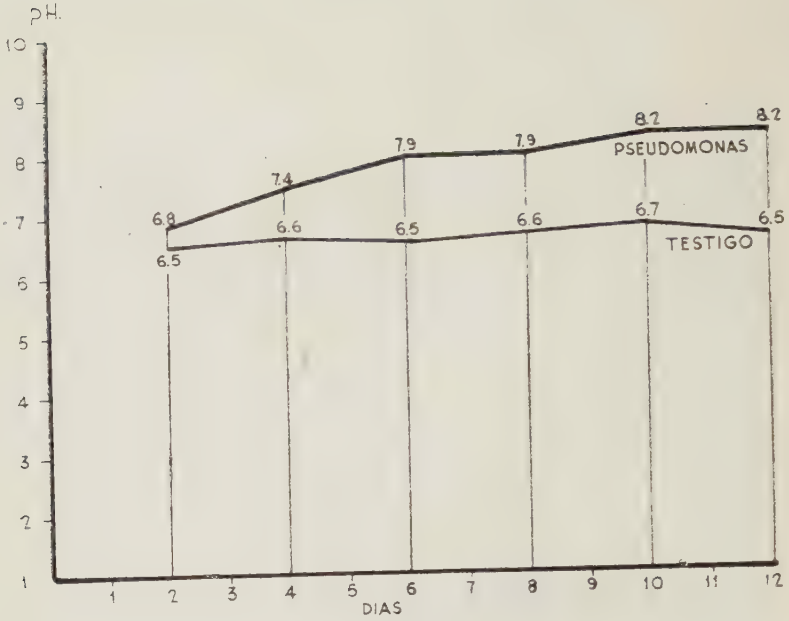


FIG. 42.
Pseudomonas savastanoi 64.

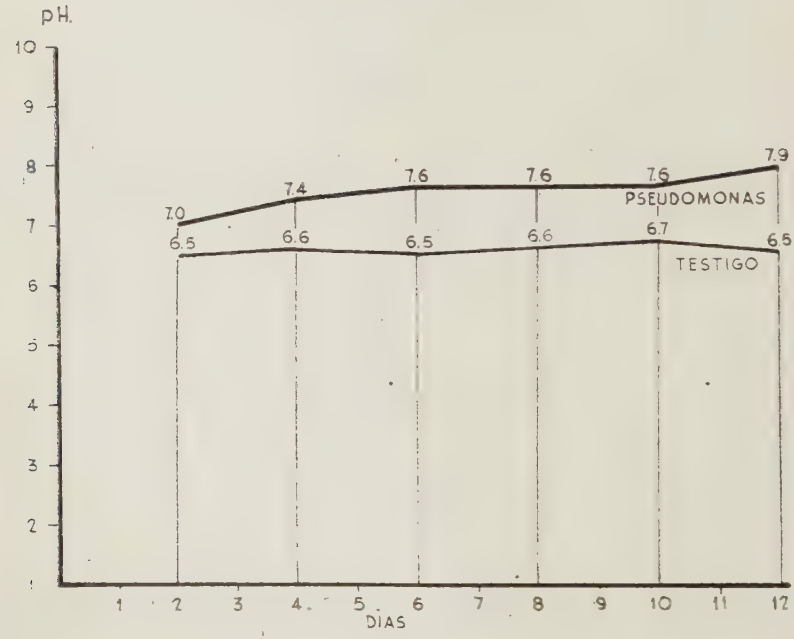


FIG. 43.
Pseudomonas savastanoi 206.

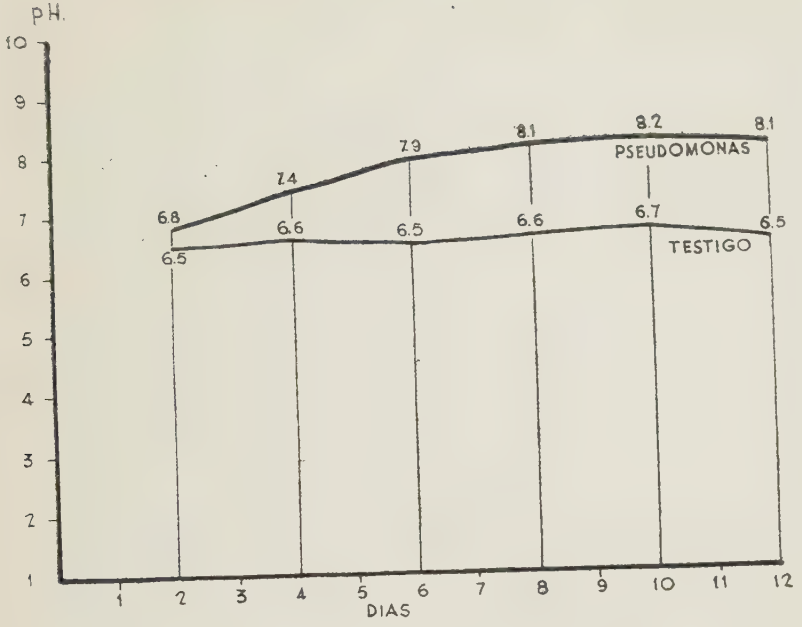


FIG. 44.
Pseudomonas savastanoi 207.

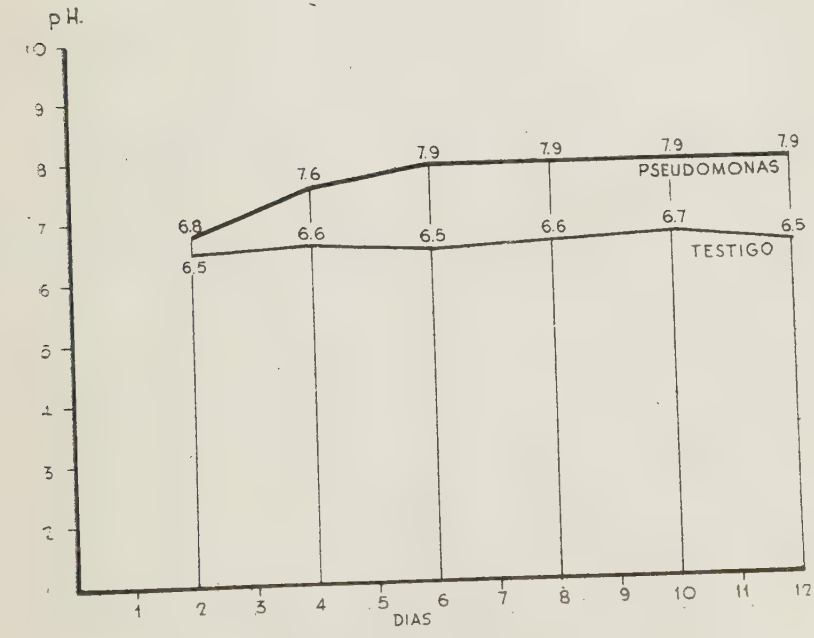


FIG. 45.
Pseudomonas savastanoi 208.

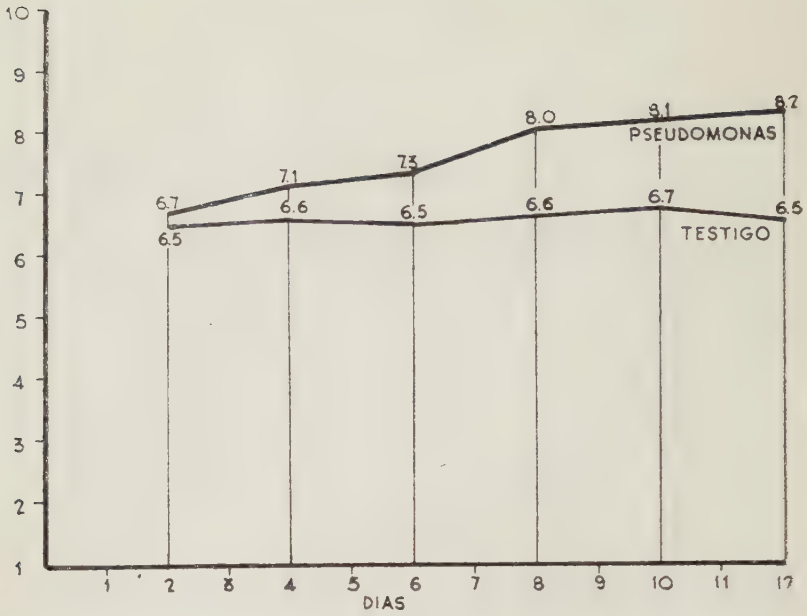


FIG. 46.
Pseudomonas pisi 123.

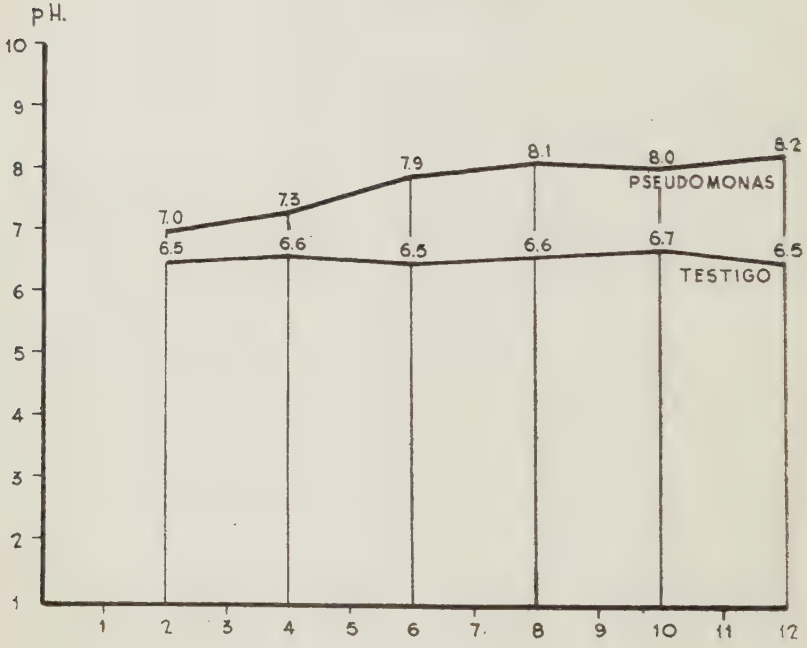


FIG. 47.
Pseudomonas marginalis 289.

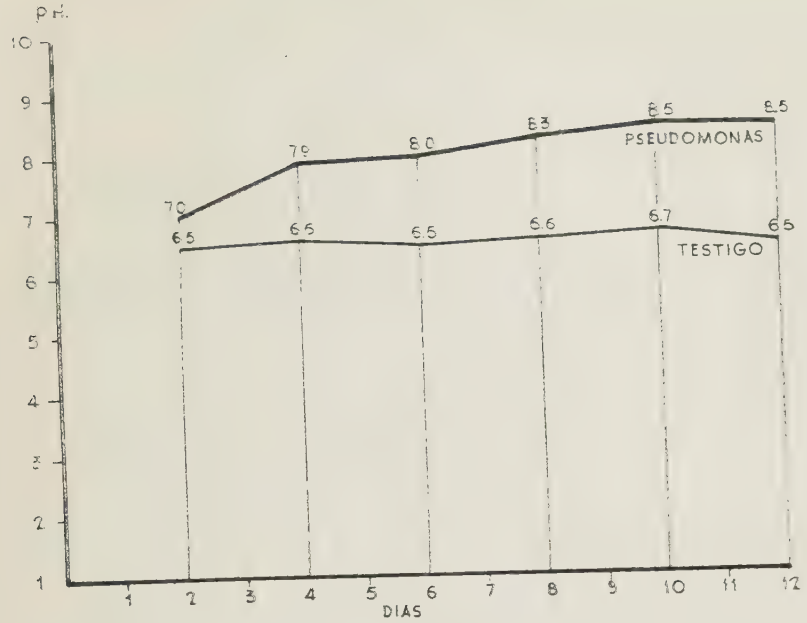


FIG. 48.
Pseudomonas syringae 294.

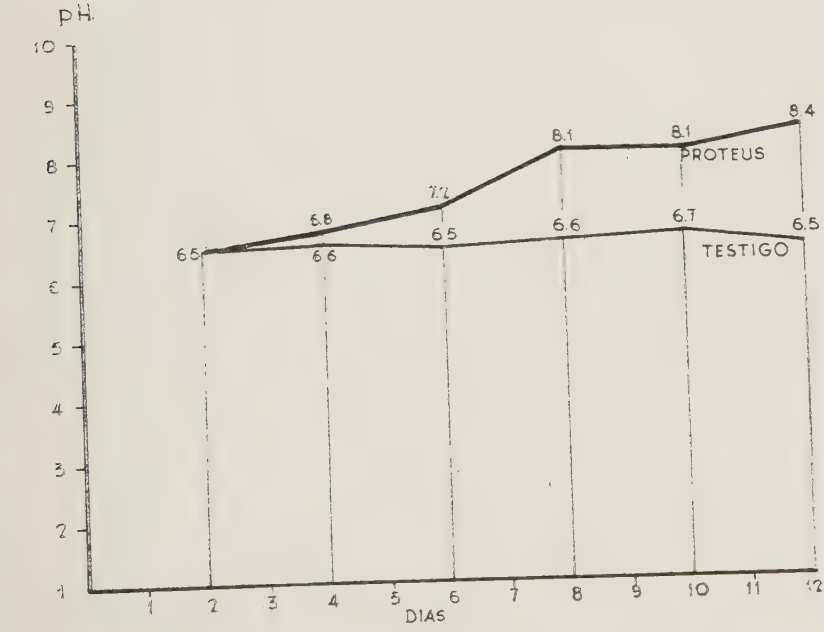


FIG. 49.
Proteus vulgaris.

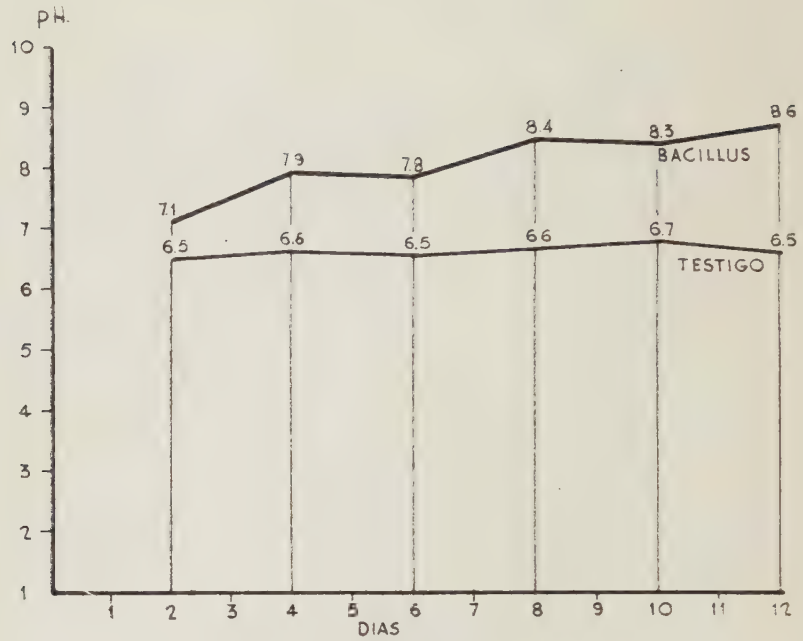


FIG. 50.
Bacillus subtilis.

Los resultados obtenidos demuestran claramente que el cambio de color rojo en el medio se retarda sensiblemente si se ajusta su pH a 6,5 y si rebajamos la proporción del indicador, y así hemos observado que el viraje no se produce del sexto al octavo día, como en las otras experiencias, sino que sólo se inicia a los doce o catorce días de incubado el medio a 24° C, y sólo con determinadas estirpes de *Pseudomonas*, tales como la *Pseudomonas pisi* 123, *Pseudomonas marginalis* 289 y *Pseudomonas syringae* 294.

Cuarta experiencia.

Por último, hemos hecho esta experiencia para ver si el medio orto-cresol-lactosa era útil para la identificación directa del *Pseudomonas sa-*

vastanoi a partir del tumor del olivo y si se correspondían los resultados en leche tornasolada y ortocresol-lactosa.

Para ello se han aislado de un tumor procedente de la muestra de olivo núm. 14 las siguientes colonias:

Colonia núm. 1—Blanca grande, extendida.
Colonia núm. 2.—Puntiforme iridiscente.
Colonia núm. 3.—Blanca con halo crema, iridiscente.
Colonia núm. 4.—Amarilla con borde inciso.
Colonia núm. 5.—Blanca cremosa, parecida a la 3.

De estos cultivos puros se sembró en matraces de 100 c. c. que contenían 20 c. c. de leche tornasolada, y a la vez en otros que contenían 20 c. c. del medio ortocresol-lactosa (pH = 7,2 por 100 de lactosa y 0,4 gramos del indicador ortocresolftaleína). Los resultados que se obtuvieron después de incubación a 25° fueron los siguientes:

DATOS OBTENIDOS A LOS OCHO DIAS DE SEMBRADOS LOS MEDIOS E INCUBADOS A 25° C.

		14 (1)	14 (2)	14 (3)	14 (4)	14 (5)	T
Leche tornasolada	Acidificación.	A	—	—	A	A	—
	Alcalinización.	—	—	+	—	—	—
	Reducción.	—	—	—	—	+	—
Ortocresol lactosa	Crecimiento.	—	—	+ + +	—	—	—
	Color rojo producido.	—	—	+ +	—	—	—

La estirpe bacteriana 14 (3), que produjo reacción alcalina en leche tornasolada y color rojo en el medio ortocresol-lactosa a los ocho días de incubación, supusimos eran *Pseudomonas savastanoi.*

Para comprobarlo se sembró en azúcares, salicina, gelatina y almidón y se hicieron con ellas las tinciones usuales en Microbiología para ver si sus caracteres morfológicos, flagelos, etc., correspondían con dicha bacteria.

Los resultados obtenidos en los azúcares, salicina, etc., a los veinticinco días de incubados a 25° C. y en la microscopía, son los siguientes:

RESULTADOS EN LA MICROSCOPIA DE LA ESTIRPE 14 (3)

	14 (3)
TINCIÓN DE GRAM	NEGATIVA
Tinción de flagelos por los métodos C. Gil y Loeffler.	Se observan flagelos polares.
Tinción de esporas por método Wirtz.	No se observan.
Tinción de cápsulas por método Antony.	No se observan.

RESULTADO DE LA ESTIRPE 14 (3) EN LOS DIVERSOS MEDIOS A LOS VEINTICINCO DIAS DE INCUBACION A 25° C.

		14 (3)
Salicina.	Fermentación.	—
	Gas.	—
	Crecimiento.	+
Xilosa.	Fermentación.	A
	Gas.	—
	Crecimiento.	+
Sacarosa.	Fermentación.	A
	Gas.	—
	Crecimiento.	+
Galactosa.	Fermentación.	A
	Gas.	—
	Crecimiento.	+
Glucosa.	Fermentación.	A
	Gas.	—
	Crecimiento.	+
Lactosa.	Fermentación.	—
	Gas.	—
	Crecimiento.	+
Maltosa.	Fermentación.	—
	Gas.	—
	Crecimiento.	+
Gelatina.	Licuefacción.	—
	Crecimiento.	—
Almidón.	Hidrólisis.	+
	Crecimiento.	—

CONCLUSIONES

Por el conjunto de resultados que hemos obtenido podemos afirmar que la estirpe bacteriana 14 (3), que aislamos del tumor, corresponde a un *Pseudomonas savastanoi*, y que prácticamente quedó identificada como tal en el primer ensayo que hicimos con ella en leche tornasolada y ortocresol-lactosa, viniendo después los resultados obtenidos en los diversos medios y en la microscopía a confirmar nuestra primera suposición.

Este medio, como se puede apreciar por esta experiencia, ha acortado considerablemente el tiempo de aislamiento e identificación de la bacteria *Pseudomonas savastanoi*.

El resultado final que se ha obtenido en todas las experiencias llevadas a cabo con el medio ortocresol-lactosa y las diferentes estirpes de *Pseudomonas* nos demuestran:

1.º Que el método propuesto es útil para la identificación de determinadas bacterias, especialmente del género *Pseudomonas*.

2.º Que otras bacterias alcalinizantes (*Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis*), no fermentadoras de lactosa, se comportan de distinta manera que las del género *Pseudomonas*.

3.º Que el cambio de color del caldo natural al rojo fuerte se produce del sexto al octavo días, siendo muy sensible a simple vista. Este cambio se produce si el indicador va en la proporción de 0,4 grs. por 1.000 el pH ajustado a 7 y la lactosa al 2 por 100.

4.º Que, según los datos y gráficas que se acompañan, se puede ver que cuando el pH es igual a 6,5 y el indicador va en la proporción de 0,1 gr. por 1.000 c. c. de caldo, se retarda sensiblemente la reacción, siendo positiva solamente con algunas estirpes de *Pseudomonas*.

5.º El indicador ortocresolftaleína parece acelerar el crecimiento bacteriano, y por esta razón en el medio ortocresol-lactosa se aprecia desde el segundo día un crecimiento muy superior al que se aprecia en el mismo caldo común testigo que se empleó para la preparación del medio.

6.º El medio ortocresol-lactosa se puede utilizar para aislar directamente la bacteria fitopatógena *Pseudomonas savastanoi* a partir del tumor por ella producido, quedando sensiblemente reducido el tiempo de aislamiento e identificación, el cual, siguiendo las técnicas usuales, es de veintiocho días. Por este método se requieren a lo máximo de ocho a diez días.

Deseo expresar mi agradecimiento, en primer lugar, al profesor doctor don Lorenzo Vilas López, jefe de la Sección de Microbiología de Madrid del Instituto de Edafología, por su dirección y constantes consejos a lo largo de este trabajo. Asimismo, doy las gracias al doctor don Román Vicente Jordana, cuya ayuda ha facilitado grandemente el desarrollo del tema. Y al Patronato «Alonso de Herrera», del C. S. I. C., por la beca concedida.

RESUMEN

En este trabajo se ha procedido primeramente al aislamiento e identificación del agente causal de la enfermedad conocida por tuberculosis del olivo, llegando a la conclusión de que en un 95 por 100 de los tumores analizados se puede aislar como agente causal el *Pseudomonas savastanoi.*

Se ha preparado un nuevo medio selectivo llamado ortocresol-lactosa, en el que se aíslan el *Ps. sacastanoi* y otros *Pseudomonas* patógenos de plantas en un período de seis a ocho días, aprovechando la propiedad proteolítica que poseen estos microorganismos. Este medio también se puede utilizar para aislar directamente el *Ps. savastanoi* a partir de los primeros cultivos aislados de los tumores, reduciéndose considerablemente el tiempo de aislamiento e identificación de esta bacteria, la cual requiere un mínimo de veintiocho días cuando se siguen las técnicas corrientes en Microbiología.

SUMMARY

Some techniques for the isolation and identification of the causig agent of the olive-tubercle have been developed. The conclusion has been reached that 95 per cent of the tumors are produced by the *Pseudomonas savastanoi.*

A new selective culture medium for which the name ortocresol-lactose is suggested, is described in which *Ps. savastanoi* and other plant pathogenic *Pseudomonas* can be isolated and identified in a period of 6-8 days, instead of the longer period (28 days) usually required when the methods of general microbiology are followed. This has been actie-

ved by taking advantage of the proteolitic property of these microorganisms.

This medium can be used to isolated *Ps. savastanoi* starting from the cultures obtained from the tumors.

It has also been observed that the indicator orto-cresolphthalein accelerates the growth of *Pseudomonas*.

BIBLIOGRAFIA

BAKER, R. I., 1950. Cytological Technique, pp. 100-170.

BONNER, I, y GALSTON, A. W., 1955. Principios de Fisiología Vegetal, pp. 364-347.

BREED, MURRAY and HITCHENS, 1948. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Sixth Edition, p. 463.

DOWSON, W. J., 1949. Manual of Bacterial Plant Diseases, pp. 10, 12, 36, 81 y 166.

D'OLIVEIRA, M.ª Lourdes, 1939. Inoculacoes experimentais com o *Bacterium savastanoi* E. F. Smith e o *Bacterium savastanoi* var: fraxini N. A. Brown. Agronomía Lusitana. Vol. I.

ELLIOTT CHARLOTTE, 1951. Manual of Bacterial Plant Phatogens. Second Edition, pp. 84, 85.

GARCÍA CABEZÓN, Andrés, 1954. Cultivo del olivo en Argentina. Rev. Agricultura, núms. 266-331.

GAUMANN, E. 1954. Toxinas y enfermesades de las plantas. Endeavour. Vol. 12. 52. 198.

GAUMANN, E., 1950. Principles of Plant infection, p. 127.

GROSSBARD, E., 1951. Los antibióticos y el antagonismo microbiano en la patología de las plantas Endeavour. Vol. 10 (39), 145-150.

HAUDUROY, EHRINGER, URBAIN, GUILLOT y MAGROU, 1937. Dictionnaire des bacteries pathogenes, pp. 409, 410.

HOPKIN and WILLIAMS, 1950. Analar Reagents, p. 131.

KNAYSI, G., 1951. Elements of Bacterial Cytology. Second Edition, pp. 63, 199, 202.

LEACH, J. G., 1940. Insect. Transmission of Plant Diseases, p. 190.

MUÑOZ J. SCHERAGO, M., and WEAVER, R. H. J., 1949. Estudio serológico de los miembros del género *Pseudomonas*. J. Bact. 57, 269.

NAVARRO LEANDRO, 1923. Las enfermedades del olivo, pp, 13, 16.

REVISTA AGRICULTURA, 1950. Núms. 224-216.

SEHEMANN NEUMANN, 1927. Bakteriologische Diagnostik. II Band Text., p. 194-302-482-604.

SMITH ERWIN, F., 1905. Some observationes on the biology of the olive-tubercle organism, Centralb f. Bakt. 15: 198, 200.

STOUGHTON, R. H., 1930. Thionin and orange G. for the differencial staining of bacterian and fungi in plant tissues. Ann. Appl. Biol. 17: 162.

WALTER C. TOBIE, 1945. A proposed Biochemical Basis for the Genus *Pseudomonas*. J. Bact., pp. 49, 459.

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Ganadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 peretas. Extranjero: número suelto, $ 1.5. Suscripción, $ 4.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativo al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE D ESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 144 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.

A. LOBO. - Libertad, 33 Teléf. 21 31 61 - MADRID

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA